

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE
ZONOSI

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: VET-06

**ELMINTI DI INTERESSE ZONOSICO IN
SPECIE ITTICHE DULCIACQUICOLE
NAZIONALI**

Presentata da: Dr. Gustinelli Andrea

Coordinatore Dottorato

Prof. Luigi Morganti

Relatore

Prof. Maria Letizia Fioravanti

Esame finale anno 2008

INDICE

	Introduzione	p. 1
1	Zoonosi parassitarie di origine ittica	p. 3
2	Plerocercosi da <i>Diphyllbothrium latum</i>	p. 15
2.1	Premessa	p. 15
2.2	Materiali e Metodi	p. 15
2.4	Risultati e Discussione	p. 22
3	Plerocercosi da cestodi Triaenophoridae	p. 44
3.1	Premessa	p. 44
3.2	Materiali e Metodi	p. 45
3.3	Risultati e Discussione	p. 49
4	Opisthorchiasi	p. 67
4.1	Premessa	p. 67
4.2	Materiali e Metodi	p. 67
4.3	Risultati e Discussione	p. 72
5	Infestazioni da trematodi digenei Heterophyidae	p. 92
5.1	Premessa	P 92
5.2	Materiali e Metodi	p. 93
5.3	Risultati e Discussione	p. 95
6	Controllo delle zoonosi parassitarie di origine ittica legate ad ambienti dulciacquicoli	p. 106
7	Normativa inerente i parassiti ittici a carattere zoonosico	p. 109
8	Considerazioni conclusive	p. 114
	Bibliografia	p. 117
	Allegato I	
	Allegato III	
	Allegato II	

INTRODUZIONE

L'epidemiologia delle zoonosi parassitarie di origine ittica ha subito importanti cambiamenti negli ultimi anni a livello mondiale. Sebbene in alcune aree geografiche la loro prevalenza sia diminuita fortemente a seguito di fattori quali lo sviluppo socio-economico, l'urbanizzazione, l'applicazione di procedure di ispezione degli alimenti, le campagne di educazione sanitaria ed il crescente utilizzo di fertilizzanti chimici (Fried *et al.*, 2004), in altre al contrario si sono osservati fenomeni di recrudescenza o di emergenza di zoonosi parassitarie di origine ittica in seguito a diversi fattori, fra cui *in primis* il cambiamento delle abitudini alimentari, l'incremento delle attività di acquacoltura o pesca condotte in ambienti dulciacquicoli e l'utilizzo di sistemi di trasporto e distribuzione dei prodotti ittici sempre più efficienti a livello locale ed internazionale (Abdussalam *et al.*, 1995; FAO, 2006).

Di conseguenza anche nei paesi occidentalizzati, dove l'interesse del mondo medico e scientifico si era concentrato negli ultimi anni soprattutto su problematiche sanitarie derivanti da parassitosi di pesci marini, quali ad esempio l'anisakiasi, l'attenzione si sta allargando ad alcune elmintiasi di animali acquatici d'acqua dolce che possono presentare un risvolto zoonosico e risultare quindi di pari importanza in sanità pubblica.

In Italia in particolare si è assistito di recente ad una recrudescenza di zoonosi parassitarie di origine ittica legate ad ambienti dulciacquicoli che si credevano ormai eradicati dal territorio nazionale, come la difillobotriasi sostenuta dal cestode *Diphyllobothrium latum*, ed all'emergenza di altre non ancora segnalate nella popolazione nazionale, come l'opisthorchiasi causata dal trematode digeneo *Opisthorchis felinus*.

Questo fenomeno ha posto in evidenza come anche nel nostro paese sussistano le condizioni utili al mantenimento del ciclo biologico di questi parassiti, individuabili nel caso della difillobotriasi nella mancata applicazione di idonei mezzi di trattamento dei reflui fognari e nel caso della opisthorchiasi nella presenza di serbatoi non umani della parassitosi. In entrambi i casi le abitudini

alimentari che comprendono il consumo di prodotti ittici dulciacquicoli crudi o poco cotti, marinati o affumicati a freddo, rappresentano il fattore di rischio primario nella trasmissione di questi parassiti zoonosici all'uomo.

Allo scopo di prevenire e controllare queste parassitosi, fino ad oggi legate ad animali acquatici selvatici pescati in ambienti di acque interne, appare di fondamentale importanza un approfondimento delle conoscenze sulla biologia degli agenti eziologici ed un affinamento delle tecniche utili alla loro diagnosi, spesso difficoltosa a causa della mancanza di caratteri tassonomici specifici (come nelle larve plerocercoidi di *D. latum*) o delle dimensioni estremamente ridotte degli stadi parassitari presenti nei pesci (come nel caso delle metacercarie di *O. felineus*).

Inoltre la recente descrizione di parassitosi nuovi per le popolazioni ittiche nazionali, quali la plerocercosi da cestodi Pseudophyllidea della specie *Triaenophorus crassus* e le infestazioni da metacercarie di trematodi digenei Heterophyidae del genere *Phagicola*, richiede una crescente attenzione a livello diagnostico ed una corretta definizione del ruolo che questi parassiti possono avere nel campo della sanità animale e della sanità pubblica.

Le attività di ricerca condotte nell'ambito del dottorato di ricerca da me svolto in "Epidemiologia e controllo delle zoonosi" hanno avuto quale obiettivo primario l'approfondimento delle conoscenze su elminti parassiti di specie ittiche dulciacquicole a carattere zoonosico o di emergente importanza sul territorio nazionale.

Per meglio illustrare i risultati di queste ricerche, dopo una breve descrizione delle principali zoonosi di origine ittica sostenute da parassiti di pesci d'acqua dolce, la presente tesi è stata suddivisa in diversi capitoli inerenti le parassitosi di cui sono stati studiati gli aspetti eziologici, biologici, epidemiologici e sanitari, con particolare riferimento alle eventuali ripercussioni in sanità pubblica.

Vengono infine presentate, in due capitoli comuni, le principali strategie di controllo applicabili agli elminti parassiti di pesci d'acqua dolce agenti di zoonosi e la normativa di riferimento.

1. ZOONOSI PARASSITARIE DI ORIGINE ITTICA

Sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli ad economia più avanzata le zoonosi possono essere considerate fra i più importanti rischi sanitari; in particolare quelle di natura parassitaria si caratterizzano per un difficile controllo a causa della frequente complessità del ciclo biologico degli agenti eziologici e delle articolate vie di trasmissione (Thompson, 2000).

Gli animali acquatici rivestono spesso un ruolo importante nel ciclo biologico di parassiti eteroxeni che allo stadio adulto o larvale sono in grado di determinare patologia nell'uomo. Quest'ultimo può infatti rappresentare l'ospite definitivo di parassiti i cui stadi larvali infettanti si sviluppano in animali acquatici o, diversamente, un ospite accidentale di parassiti destinati a divenire adulti in altri vertebrati omeotermi (Fioravanti e Restani, 2003).

In relazione alla prima eventualità vanno citate numerose malattie parassitarie, fra cui alcune sostenute da cestodi (Difillobotriasi), altre da trematodi Digenea (Heterofiasi, Opisthorchiasi, Clonorchiasi, Paragonimiasi) e da nematodi (Dioctofimosi e Capillariosi intestinale), tutte sostenute da elminti che possono raggiungere lo stadio adulto e la maturità sessuale nell'organismo umano. Per quanto riguarda la seconda possibilità, vanno invece ricordate in particolare Anisakiasi, Gnatostomiasi e Clinostomosi, malattie parassitarie i cui agenti eziologici possono causare patologia nell'uomo in via accidentale, riconoscendo in altri vertebrati gli ospiti definitivi idonei.

Per quanto concerne l'Italia, negli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi sull'Anisakiasi ittica ed umana, con descrizione di decine di casi nell'uomo a partire dal 1996 e studi epidemiologici sulla diffusione di larve Anisakidae in specie ittiche pescate nei mari nazionali.

Risultano invece carenti, se non addirittura assenti, i dati sulla presenza e diffusione di parassiti agenti di zoonosi in popolazioni ittiche dulciacquicole, sia per il minore valore commerciale che i pesci d'acqua dolce rivestono rispetto a quelli marini, sia per la mancanza di informazioni sulla casistica umana ad essi eventualmente correlata. La riemergenza della difillobotriasi da *Diphyllbothrium latum* a partire dal 2001 (Terramocci *et al.*, 2001) e

l'emergenza della opisthorchiasi da *Opisthorchis felineus* a partire dal 2003 (Crotti *et al.*, 2004) hanno invece indicato la necessità di riprendere o intraprendere ricerche su queste tematiche di crescente importanza in sanità pubblica.

1.1 ZOONOSI SOSTENUTE DA ELMINTI DI SPECIE ITTICHE DULCIACQUICOLE

Le zoonosi parassitarie di origine ittica in generale, e quelle legate agli ambienti dulciacquicoli in particolare, sono state associate nel passato a paesi economicamente sottosviluppati o in via di sviluppo, ma recentemente l'espansione del mercato globale, il miglioramento delle vie di trasporto commerciali e l'aumento dei flussi migratori tra popolazioni ha ampliato enormemente i limiti geografici delle aree a rischio (Chai *et al.*, 2005).

Questi fattori, associati ad altri quali le tradizioni culinarie da una parte ed il cambio di abitudini alimentari dall'altra, la gestione degli animali acquatici e dei prodotti derivati, le scarse condizioni igienico-sanitarie o la carente educazione alimentare, hanno portato la comunità internazionale a valutare attentamente l'impatto sanitario e socio-economico di queste problematiche, particolarmente evidente in Asia (Orlandi *et al.*, 2002; WHO, 1995; 2004), ma progressivamente sempre più importante a livello globale.

Il continente asiatico ha da sempre recitato un ruolo di primo piano come *pabulum* per lo sviluppo di queste parassitosi dal punto di vista sociale e culturale e, sebbene alcune patologie come la Difillobotriasi possano essere considerate a diffusione cosmopolita e strettamente legate all'ambiente selvatico, ne esistono alcune ad impatto enorme, le infestazioni da stadi larvali da trematodi digenei su tutte, che in queste zone possono trovare un terreno ideale per svilupparsi anche in condizioni di allevamento, nonostante l'attuale mancanza di dati certi in merito (Chai *et al.*, 2005).

Facendo una stima delle popolazioni a rischio per le infestazioni da trematodi digenei, si è rilevato che attualmente oltre 600 milioni di persone sono a rischio per l'infestazione da *Clonorchis sinensis* (di cui 21 nella sola Korea e 570 in Cina e Taiwan), 293 milioni per quella da *Paragonimus* spp. (con 195 milioni di

persone a rischio in Cina, ma anche in Korea, Filippine ed una parte dell'Africa occidentale) (Keiser e Utzinger, 2005).

Per quanto concerne *Opisthorchis* spp., le persone a rischio sarebbero virtualmente 79 milioni, data la presenza di *Opisthorchis viverrini* in Cambogia, Laos, Tailandia e Vietnam, e quella di *Opisthorchis felineus* soprattutto in Russia, Kazakistan ed Ucraina.

Per quanto riguarda la distribuzione di altri trematodi digenei zoonosici, ricordiamo che quelli appartenenti alla famiglia Echinostomatidae sono stati rilevati in Cina, Malesia, Indonesia, Filippine, Corea, Taiwan e Tailandia (Keiser e Utzinger, 2005). Tra i digenei Heterophyidae, le due specie di maggiore rilevanza medica, *Heterophyes heterophyes* e *Metagonimus yokogawai* sono maggiormente presenti nei Balcani, Cina, Corea, Giappone (Macpherson, 2005), Sudan, Tailandia, Turchia, Filippine, Indonesia, Egitto, India, Iran, Israele, Spagna e Tunisia (Keiser e Utzinger, 2005), come riportato nella tabella seguente (da Keiser e Utzinger, 2005).

Table 1. Geographic distribution and population at risk for major foodborne trematode infections

Foodborne trematodes	Species	Geographic distribution	Second intermediate hosts; habitats	Population at risk ($\times 10^6$)
Liver flukes	<i>Clonorchis sinensis</i>	China (except for Inner Mongolia, Ningxia, Qinghai, Tibet, Xinjiang), Republic of Korea, Taiwan, Vietnam*	>100 species of freshwater fish; freshwater habitats with stagnant or slow-moving waters (ponds, river, aquaculture, swamps, rice fields)	601.0†
	<i>Opisthorchis felineus</i>	Kazakhstan, Russian Federation, Siberia, Ukraine‡	>35 species of freshwater fish; freshwater habitats with stagnant or slow-moving waters (ponds, river, aquaculture, swamps, rice fields)	12.5§
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	Cambodia, Lao People's Democratic Republic, Thailand, Vietnam‡	>35 species of freshwater fish; freshwater habitats with stagnant or slow-moving waters (ponds, river, aquaculture, swamps, rice fields)	67.3¶
	<i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola gigantica</i>	Altiplano of Bolivia, Cuba, highlands of Ecuador and Peru, Nile delta of Egypt, northern Islamic Republic of Iran, Portugal, Spain‡	Watercress and other water plants (drinking water); irrigation channels, pastures, banks of rivers, ponds, pools	91.1#
Lung flukes	<i>Paragonimus</i> spp.	Southwestern Cameroon, China, Ecuador, eastern Nigeria, Peru, the Philippines, Republic of Korea**	>50 species of freshwater crab and crayfish; freshwater habitats with stagnant or slow-moving water (ponds, aquaculture)	292.8††
Intestinal flukes	<i>Fasciolopsis buski</i>	Bangladesh, China, India, Indonesia, Malaysia, Taiwan, Thailand‡‡	Water caltrop, water chestnut, water hyacinth, water bamboo, duckweed, water mimosa, water spinach; drainage systems of pig farms, freshwater habitats with stagnant or slow-moving waters	Not known
	<i>Echinostoma</i> spp.	China, Indonesia, Malaysia, the Philippines, Republic of Korea, Taiwan, Thailand‡‡	Molluscs, fish, snails and tadpoles; freshwater or brackish habitats with stagnant or slow-moving waters	Not known
	<i>Heterophyes heterophyes</i>	China, Egypt (Nile delta), India, Indonesia, Islamic Republic of Iran, Philippines, Sudan, Taiwan, Tunisia, Turkey‡‡	Brackish water fish (mullets, perches, gobies); brackish water habitats	Not known
	<i>Metagonimus yokogawai</i>	The Balkans, China, Indonesia, Islamic Republic of Iran, Israel, Japan, Republic of Korea, Spain, Taiwan‡‡	Freshwater (Cyprinid) fish; freshwater habitats	Not known

Da un punto di vista patogenetico, i digenei trasmissibili all'uomo tramite consumo di animali acquatici possono causare principalmente problemi epatici, polmonari e/o intestinali.

Fra i trematodi digenei in grado di determinare affezioni a livello intestinale, ricordiamo quelli appartenenti al genere *Echinostoma* (Chai *et al.*, 2005), di cui si conoscono 16 specie che possono causare patologie nell'uomo e la maggior parte delle quali presenti in forma endemica nel sud-est asiatico; i sintomi rilevabili in associazione all'infestazione sono anemia, mal di testa, dolore addominale, diarrea, anoressia, capogiro, e la diagnosi viene fatta mediante rilevamento delle uova nelle feci (Butt *et al.*, 2004).

Va comunque rimarcato che i più importanti trematodi intestinali di origine ittica che colpiscono l'uomo appartengono alla famiglia *Heterophyidae*, e più precisamente sono *Metagonimus yokogawai* ed *Heterophyes heterophyes*. *M. yokogawai* rappresenta un importante parassita zoonosico in Giappone in seguito alla sempre viva abitudine di mangiare *sushi* e *sashimi* a base del famoso pesce "Ayu" (*Plecoglossus altivelis*), suo ospite intermedio (Nawa *et al.*, 2005). I sintomi dell'infestazione da *Metagonimus* possono andare da dolore epigastrico, diarrea e anoressia delle forme lievi a crampi addominali, malassorbimento e perdita di peso in quelle più gravi. La diagnosi viene fatta tramite il rilevamento e l'identificazione delle uova del parassita nei campioni fecali dei pazienti (Chai *et al.*, 2005).

H. heterophyes è diffuso in popolazioni ittiche salmastre, rappresentate soprattutto da Mugilidi. Descritto soprattutto in Estremo Oriente, è molto diffuso anche in Egitto e risulta segnalato in Israele, Grecia, Francia e Spagna. In Italia è stata descritta la presenza di questo parassita allo stadio adulto in Sicilia e Sardegna nel cane; inoltre metacercarie di trematodi *Heterophyidae* sono state reperite in mugilidi pescati in Sardegna. La sintomatologia nell'ospite definitivo consiste generalmente in sindromi diarroiche di lieve entità, anche se si possono avere complicazioni dovute alla localizzazione cerebrale o miocardica delle uova qualora dovessero andare in circolo in seguito all'ulcerazione della mucosa intestinale e degenerazione degli adulti.

Fra i trematodi digenei che si localizzano nel tratto digerente, anche se a livello prossimale, e potenzialmente patogeni per l'uomo vanno ricordati quelli della famiglia Clinostomatidae ed in particolare quelli appartenenti alla specie *Clinostomum complanatum*. Ospiti definitivi idonei di *C. complanatum* sono rappresentati da uccelli ittiofagi, soprattutto ardeiformi, in cui si localizzano a livello della cavità orale e/o dell'esofago provocando dolorose ulcere emorragiche. L'uomo può assumere l'infestazione cibandosi di pesci dulciacquicoli crudi o poco cotti parassitati dalle metacercarie del parassita a livello muscolare e sottocutaneo. A diffusione cosmopolita, *C. complanatum* è stato descritto anche in Italia sia in pesci che in aironi, anche se ad oggi non risultano descritti casi umani della parassitosi.

I trematodi digenei che si localizzano a livello polmonare appartengono al genere *Paragonimus*, e le due maggiori specie di interesse zoonosico sono *Paragonimus westermani* e *Paragonimus skrjabini*, che possono infestare l'uomo quando questo si nutre di granchi crudi o poco cotti; i principali sintomi della parassitosi sono dati da febbre e tosse (Butt *et al.*, 2004). La diagnosi in questo caso viene fatta rilevando la presenza delle uova nello *sputum* del paziente, ma anche mediante analisi parassitologica di campioni prelevati mediante sonda e test sierologici (Nawa *et al.*, 2005).

Fra i parassiti epatici più rilevanti va senz'altro annoverato *Clonorchis sinensis*, detto anche "verme epatico cinese" (Butt *et al.*, 2004), che negli individui infestati può causare ittero ostruttivo e, nei casi più gravi, cirrosi epatica e carcinoma colangiocellulare. La diagnosi viene eseguita mediante reperimento delle uova del parassita nelle feci (Nawa *et al.*, 2005). Altri parassiti epatici sono *Opisthorchis* spp. (Venugopal, 2006), di cui si parlerà più dettagliatamente nei capitoli successivi, e *Methorchis conjunctus*, detto "verme epatico canadese" a causa dello scoppio di un focolaio in Quebec nel 1996 (Butt *et al.*, 2004), anche se era segnalato in Canada e negli Stati Uniti già dal 1946 (Chai *et al.*, 2005). Nel focolaio del 1996, 17 persone che avevano consumato pesce pescato in un fiume mostrarono i sintomi della parassitosi dopo un periodo di incubazione variabile tra 1 e 15 giorni; i sintomi riportati

furono febbre, dolore addominale, diarrea, mal di testa e nausea (Butt *et al.*, 2004).

Comunque oltre 50 specie di trematodi intestinali di origine ittica sono state descritte nell'uomo a livello mondiale (Waikagul, 1991; Chai *et al.*, 2005).

Sebbene la prevalenza di infestazioni da trematodi digenei di origine alimentare sia diminuita notevolmente in alcune zone, per esempio il Giappone, dove però hanno ancora grossi problemi con *Anisakis* (Nawa *et al.*, 2005), in numerose altre si è verificato un netto aumento della loro presenza. In Cina le persone infestate da *Clonorchis sinensis* sono addirittura triplicate nel corso dell'ultima decade, fino ad arrivare nel 2004 a 15 milioni, secondo Keiser e Utzinger (2005). Tale aumento può essere messo in relazione al notevole incremento delle attività di commercializzazione e consumo di prodotti ittici e dell'acquacoltura che si sta registrando a livello dei mercati locali ed internazionali. In particolare, dal 1970 al 2000 la percentuale di prodotti ittici consumati provenienti da attività di acquacoltura rispetto a quelli derivati da attività di pesca è passata dal 5,3% al 32,2% e nel 2030 si stima che la metà del pesce consumato proverrà dall'acquacoltura (FAO, 2006).

Nel 2000 la produzione globale proveniente dal settore dell'acquacoltura è stata di 45,7 milioni di tonnellate, il 91% delle quali è stato prodotto in Asia.

Nei paesi dove vengono registrate le maggiori produzioni ittiche, come per esempio la Cina, la produzione è passata da 136000 tonnellate (tons) nel 1952 a 16,6 milioni di tons nel 2002 (Keiser e Utzinger, 2005). La produzione di pesce ha subito un incremento notevolissimo in Myanmar ed in Vietnam, come si evince dall'immagine successiva, dove si è passati dalle 41750 tons del 1962 alle 390000 tons del 2005 grazie soprattutto alla produzione di pangasio (*Pangasius hypophthalmus*) (FAO, 2006; Thien *et al.*, 2007).

In questi paesi si allevano numerose specie ittiche che rappresentano potenziali ospiti intermedi nel ciclo biologico di trematodi digenei a carattere zoonosico, come ad esempio la carpa erbivora *Ctenopharyngodon idellus*, la cui produzione rappresenta un importante settore dell'acquacoltura cinese per

la preparazione del *sushi*, presentando una produzione che è passata da 10500 tonnellate nel 1950 ad oltre 3 milioni di tonnellate nel 2002.

Table 4

Top ten aquaculture producers of food fish supply: quantity and emerging growth

Producer	2002 (Tonnes)	2004 (Tonnes)	APR (Percentage)
Top ten producers in terms of quantity, 2004			
China	27 767 251	30 614 968	5.0
India	2 187 189	2 472 335	6.3
Viet Nam	703 041	1 198 617	30.6
Thailand	954 567	1 172 866	10.8
Indonesia	914 071	1 045 051	6.9
Bangladesh	786 604	914 752	7.8
Japan	826 715	776 421	-3.1
Chile	545 655	674 979	11.2
Norway	550 209	637 993	7.7
United States of America	497 346	606 549	10.4
TOP TEN SUBTOTAL	35 732 648	40 114 531	6.0
REST OF THE WORLD	4 650 830	5 353 825	7.3
TOTAL	40 383 478	45 468 356	6.1
Top ten producers in terms of growth, 2002-04			
Myanmar	190 120	400 360	45.1
Viet Nam	703 041	1 198 617	30.6
Turkey	61 165	94 010	24.0
Netherlands	54 442	78 925	20.4
Republic of Korea	296 783	405 748	16.9
Iran (Islamic Rep. of)	76 817	104 330	16.5
Egypt	376 296	471 535	11.9
Chile	545 655	674 979	11.2
Thailand	954 567	1 172 866	10.8
United States of America	497 346	606 549	10.4

Note: Data exclude aquatic plants. APR refers to the average annual percentage growth rate for 2002-04.

Fonte: FAO 2006: www.fao.org/docrep/009/a0699e/A0699E00.htm

L'enorme sviluppo in acquacoltura che caratterizza questi paesi va di pari passo con un ingente aumento della domanda e, di conseguenza, delle importazioni di prodotti ittici da parte dei paesi occidentali, in cui l'Italia si colloca al quarto posto assoluto a livello mondiale, come appare evidente nella tabella seguente (FAO, 2006).

Table 11
Top ten exporters and importers of fish and fishery products

	1994	2004	APR
	(US\$ millions)		(Percentage)
Importers			
Japan	16 140	14 560	-1.0
United States of America	7 043	11 967	5.4
Spain	2 639	5 222	7.1
France	2 797	4 176	4.1
Italy	2 257	3 904	5.6
China	856	3 126	13.8
United Kingdom	1 890	2 812	4.1
Germany	2 316	2 805	1.9
Denmark	1 415	2 286	4.9
Republic of Korea	718	2 233	12.0
TOP TEN SUBTOTAL	38 063	53 090	3.4
REST OF THE WORLD TOTAL	13 104	22 202	5.4
WORLD TOTAL	51 167	75 293	3.9

Fonte: FAO 2006: www.fao.org/docrep/009/a0699e/A0699E00.htm

In questo contesto globale si può facilmente comprendere come la precisa conoscenza delle situazioni epidemiologiche inerenti le zoonosi parassitarie di origine ittica, sia nei paesi esportatori che in quelli importatori, sia condizione imprescindibile per la valutazione di tutti i fattori di rischio insiti in tale mercato.

Lo sviluppo ed il mantenimento delle infestazioni da digenei di origine alimentare è legato a diversi fattori, ed in particolare quelli di carattere ambientale ed ecologico da un lato e quelli comportamentali, socioeconomici e culturali dall'altro.

Ad esempio, la sopravvivenza delle popolazioni di invertebrati che fungono da primo ospite intermedio per i trematodi digenei dipende da molteplici fattori ambientali, come ad esempio la qualità e la temperatura dell'acqua. Per *Clonorchis sinensis*, inoltre, sebbene la prevalenza dell'infestazione all'interno della popolazione di gasteropodi possa anche essere nelle zone endemiche inferiore allo 0,08%, è comunque sufficiente a mantenere il ciclo biologico in quanto i gasteropodi infestati da *C. sinensis* possono rilasciare anche 788 cercarie per gasteropode quotidianamente, fino anche ad un massimo di 5840 cercarie prodotte per ogni individuo. Questo aspetto è simile a quello di

Opisthorchis viverrini, che può rimanere endemico in zone dove la prevalenza all'interno delle popolazioni di *Bithynia* non supera lo 0,9% (Ditrich *et al.*, 1990). Inoltre, la produzione di cercarie può durare per alcuni mesi: in Corea è stato osservato per esempio che può prolungarsi da maggio fino ad ottobre, mentre in Taiwan tra marzo ed ottobre (Chai *et al.* 2005).

Per quanto concerne i secondi ospiti intermedi, oltre 100 specie di pesci possono essere il secondo ospite intermedio di *Clonorchis sinensis*, più di 35 specie per *Opisthorchis* spp. ed oltre 50 specie di crostacei sono stati identificati come possibile secondo ospite intermedio di *Paragonimus* spp.

Ad eccezione dei secondi ospiti intermedi dei digenei Heterophyidae, che colonizzano le acque salmastre (ad esempio cefali e gobidi), gli ospiti intermedi degli altri gruppi di digenei presi in considerazione sono presenti in acque dulciacquicole a carattere stagnante o a scorrimento lento. Questo vuol dire che facilmente questi parassiti possono colonizzare animali acquatici presenti in stagni e in canali usati per l'irrigazione dei campi di riso.

I fattori comportamentali coinvolti nel mantenimento delle infestazioni da trematodi digenei nei paesi in via di sviluppo sono rappresentati, per esempio, dalla pratica di fertirrigare anche con acque luride gli ambienti utilizzati a scopo d'allevamento ittico. In generale in tutti i paesi l'abitudine di consumare i prodotti ittici crudi o poco cotti rappresenta il principale fattore di rischio nell'assunzione di queste parassitosi da parte dell'uomo. Nelle aree di endemia per *C. sinensis*, è stato inoltre rilevato che la prevalenza nell'uomo è correlata in modo significativo con l'età ed il sesso: gli uomini sono infatti più colpiti delle donne, e gli adulti più dei bambini. Questa maggior infestazione dell'uomo rispetto alla donna è dovuta probabilmente all'abitudine maschile di uscire con amici per andare a mangiare fuori, consumando il pesce crudo, piatto tipico delle zone. Se prendiamo in considerazione l'opisthorchiasi sostenuta da *Opisthorchis viverrini*, invece, possiamo notare come ad esempio in Thailandia non vi siano differenze in base al sesso e all'età, fatto spiegabile con le diverse abitudini alimentari, dove le madri sono abituate ad alimentare gli infanti con pesce crudo o poco cotto.

I piatti a base di pesce crudo comunemente e tradizionalmente consumati son ad esempio in Tailandia il *lab-pla* ed il *plasom*, in Korea il *ke-jang* (vedi immagine a fianco), in Cina il *yusheng zho* (Keiser e Utzinger, 2005).

Il consumo di prodotti di origine ittica crudi o poco cotti è alla base anche dei meccanismi di trasmissione delle larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp. all'uomo, di cui si è osservata una recrudescenza negli ultimi anni in gran parte dei paesi sub-alpini endemici per difillobotriasi, Italia compresa.

La situazione italiana non è assolutamente paragonabile a quella dei paesi asiatici per quanto riguarda il rischio di trasmissione di parassiti ittici con il cibo, in quanto l'acquacoltura nel nostro paese presenta delle caratteristiche nettamente differenti da quelle presenti nei paesi asiatici e tali da non favorire lo sviluppo di parassiti a ciclo complesso. Inoltre nel nostro paese l'abitudine di consumare pesce crudo era finora poco diffusa e legata a realtà a carattere strettamente locale.

Negli ultimi anni però anche grazie alla globalizzazione dei mercati e all'aumento dei trasporti internazionali c'è stato un aumento del consumo di cibi esotici, con preparazioni culinarie a base di pesce crudo come ad esempio il *sushi* od il *sashimi*, che ha comportato di conseguenza un maggior rischio di contrarre parassitosi già presenti sul territorio oppure di importare patologie un tempo sconosciute: per esempio in analogia negli Stati Uniti nel 1990 erano presenti circa 13 specie di parassiti trasmissibili all'uomo con il cibo, mentre ora sono addirittura aumentate di otto volte (Orlandi *et al.*, 2002).

Alla movimentazione del mercato si aggiunge il crescente problema della movimentazione delle persone, che in Italia come in altri paesi può determinare un incremento dei casi umani d'infestazione. Per esempio sono molti i casi riportati in Nord America di immigrati con un'infestazione cronica da *Clonorchis/Opisthorchis*, specialmente tra i rifugiati del sud-est asiatico (Chai *et al.*, 2005), mentre Yossepowitch *et al.* (2004) hanno riportato un caso di opisthorchiasi sostenuta da *Opisthorchis felineus* in un'intera famiglia russa residente in Israele: uno dei familiari era tornato a fare visita ai propri familiari

residenti in Siberia, dove la malattia è endemica, e si era infestato mangiando un pesce con delle metacercarie.

Nel nostro Paese le zoonosi parassitarie di origine ittica più studiate sono rappresentate da Difillobotriasi ed Anisakiasi, di cui risultano documentati numerosi casi umani, ma la recente descrizione di alcuni casi di Opisthorchiasi umana da *Opisthorchis* spp. legati al consumo di preparazioni a base di prodotti ittici dulciacquicoli crudi o sottoposti a tecniche di marinatura a freddo, ha posto in evidenza come i cambiamenti nelle abitudini alimentari registrate in questi ultimi anni abbiano favorito in modo determinante l'insorgenza di zoonosi mai descritte nel nostro paese e la recrudescenza di quelle patologie storiche che si riteneva fossero ormai eradicate, come la difillobotriasi.

Quest'ultima zoonosi, sostenuta da cestodi Pseudophyllidea della famiglia Diphyllbothriidae, è descritta in Italia fin dall'800 nelle popolazioni delle regioni settentrionali limitrofe ai laghi alpini e sub-alpini, laddove esistono le condizioni ottimali per la realizzazione del ciclo biologico dell'agente eziologico, *Diphyllbothrium latum*. L'importanza di questa parassitosi ittica in sanità pubblica era ancora ampiamente riconosciuta nella prima metà del Novecento, tanto che venne inserita nel Regolamento di Polizia Veterinaria del 1954 quale malattia dei pesci soggetta a denuncia.

Nonostante l'applicazione di piani di controllo e profilassi, basati essenzialmente su sistemi di canalizzazione fognaria e depurazione delle acque luride, volti ad impedire l'introduzione nelle acque libere delle uova del parassita eliminate con le feci dall'ospite definitivo, rappresentato *in primis* dall'uomo, abbia permesso di ridurre enormemente la diffusione di questa parassitosi, il fatto che non si sia giunti ad una completa eradicazione dal territorio nazionale è dimostrato dai numerosi casi umani individuati negli ultimi 6 anni sul Lago di Como e su laghi sub-alpini presenti sul territorio svizzero e francese (Vaiani *et al.*, 2006; Dupuoy-Camet e Peduzzi, 2004).

Anche in questo caso il cambiamento delle abitudini alimentari, che ha comportato un aumento del consumo di prodotti ittici d'acqua dolce sotto forma di preparazioni "a rischio", quali ad esempio il carpaccio di pesce persico, i filetti

di tinca o carpa marinati, i filetti di pesci di lago affumicati a freddo, ha senz'altro giocato un ruolo importante nella riemergenza della difillobotriasi umana in Italia, unitamente al mantenimento di situazioni di endemia in alcuni laghi sub-alpini, con diffusa presenza di larve plerocercoidi del parassita nelle popolazioni ittiche lacustri.

Nel capitolo successivo vengono presentati i risultati di indagini parassitologiche volte ad aggiornare i dati sulla plerocercosi da *D. latum* nei pesci presenti in alcuni laghi sub-alpini, con particolare attenzione al lago di Como, e sui casi umano descritti negli ultimi anni presso le strutture ospedaliere presenti sul territorio.

2. PLEROCERCOSI DA *DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM*

2.1 PREMESSA

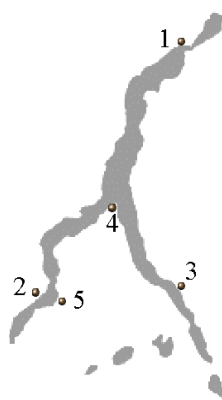
Dopo decenni di segnalazioni sporadiche, numerosi casi umani di Difillobotriasi da *Diphyllbothrium latum* sono stati diagnosticati a partire dal 2001 presso gli ospedali di Como e Lecco, sempre in associazione al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti proveniente da attività locali di pesca (Terramocci *et al.*, 2001; Vaiani *et al.*, 2006).

Nel triennio 2005-2007 sono state quindi condotte indagini parassitologiche volte ad aggiornare i dati sulla plerocercosi ittica da *D. latum* nel lago di Como, dove le ultime ricerche erano state condotte oltre trent'anni fa (Borroni e Grimaldi, 1973), ed a mettere a punto tecniche diagnostiche utili all'identificazione delle larve plerocercoidi a livello di specie.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 CAMPIONAMENTO

Data la peculiare conformazione del lago di Como, che lo fa assomigliare ad una Y rovesciata, per la conduzione delle indagini realizzate nel periodo 2005-2007 sono state individuate 5 diverse stazioni di campionamento di cui 3 disposte lungo le diverse branche del lago (1. Domaso, 2. Carate Urio e 3. Mandello del Lario), una alla loro confluenza (4. Bellagio) ed una accessoria a Faggeto Lario (5).



1. Domaso
2. Carate Urio
3. Mandello del Lario
4. Bellagio
5. Faggeto Lario

Nel corso del 2005 sono state inoltre condotte indagini parassitologiche anche su campioni ittici provenienti dal Lago d'Orta e dal Lago d'Iseo allo scopo di documentare l'eventuale presenza della parassitosi anche in questi ambienti lacustri.

Tutti i campionamenti venivano condotti in stretta collaborazione con l'Ufficio Caccia e Pesca della Provincia di Como ed i pescatori professionisti operanti sul territorio.

Sono stati campionati, sempre mediante l'utilizzo di reti alla posta, 681 soggetti di pesce persico (*Perca fluviatilis*), 4 soggetti di luccio europeo (*Esox lucius*), 6 esemplari di bottatrice (*Lota lota*) e 22 di lavarello (*Coregonus lavaretus*). In tabella 1 vengono riportati i campionamenti effettuati nel triennio 2005-2007 sul lago di Como in relazione a stazione e periodo di campionamento.

Tab. 1: Campionamenti effettuati nel triennio 2005-2007 sul lago di Como con indicazione delle stazioni di campionamento e del numero di soggetti esaminati.

Anno	Stazioni	Mese di campionamento	N pesci esaminati
2005	Domaso	Ottobre	53
	Mandello del Lario		50
	Carate Urio		71
	Bellagio	Novembre	41
	Totale		215
2006	Bellagio	Luglio	55
	Mandello del Lario		52
	Carate Urio	Settembre	52
	Domaso		51
	Totale		210
2007	Bellagio	-	-
	Mandello del Lario	Novembre	33
	Carate Urio		50
	Domaso		50
	Totale		133
Totale complessivo			558

Inoltre nel 2006, su richiesta del responsabile di una ditta di trasformazione e confezionamento di trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento sita in provincia di Trento, sono stati esaminati anche 30 soggetti di trota salmonata di taglia commerciale.

Nel 2005 dalla stazione di Faggeto Lario sono stati analizzati 51 persici nel mese di novembre, mentre nel Lago d'Orta ne sono stati campionati 35, di cui 8 in Luglio e 27 in Agosto, e nel Lago d'Iseo 37 esemplari tutti nel mese di ottobre.

2.2.2 RICERCA DI LARVE PLEROCERCOIDI

La ricerca delle larve plerocercoidi in pesce persico, lavarello e trota è stata svolta secondo le modalità della filettatura commerciale (Fig. 1), le cui fasi vengono di seguito indicate:

- I. asportazione della testa del pesce, con ispezione del tessuto muscolare retronucale, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di larve plerocercoidi;
- II. dissezione della cavità addominale a livello della linea ventrale mediana, mediante introduzione della lama del coltello nell'apertura anale ed incisione fino alla zona giugulare;
- III. asportazione dei visceri dalla cavità addominale ricercando attentamente gli eventuali parassiti presenti secondo le modalità indicate nella SOP MIPAV 10.01.02 (Vedi Allegato I);
- IV. recisione del pesce in due parti lungo la linea sagittale mediana;
- V. asportazione della colonna vertebrale rimasta adesa ad uno dei due filetti ed osservazione delle porzioni muscolari in essa comprese;



Fig. 1 - Modalità di filettatura commerciale del pesce persico

- VI. rimozione della cute dai due filetti;
- VII. osservazione dei filetti mediante “speratura” (vedi paragrafo successivo);
- VIII. nel caso i filetti fossero troppo spessi, preparazione di sezioni parallele più sottili (spessore 3-4 mm) e loro osservazione.

La “speratura” (*candling*) consiste nell’osservazione di porzioni muscolari in controluce ed è agevolata dall’utilizzo di uno strumento apposito (“transilluminatore”). Dovendo spesso operare la ricerca delle larve plerocercoidi direttamente presso i locali di filettatura in condizioni operative precarie, con scarsa illuminazione e rapidamente, si è provveduto alla costruzione di un transilluminatore da campo (Codex Alimentarius, 1976; M.P.O.; 1983; Valdimarsson, 1985; AOAC., 1995).

A tal scopo si è utilizzata una cassetta rettangolare in metallo, costituita da un coperchio dotato di una lastra di vetro opacizzata e da una camera interna in cui era posta una lampada a luce fredda, idonea a non riscaldare troppo la lastra di vetro e quindi a non interferire con la qualità e la commerciabilità del filetto in esame (Fig. 2 e 3).

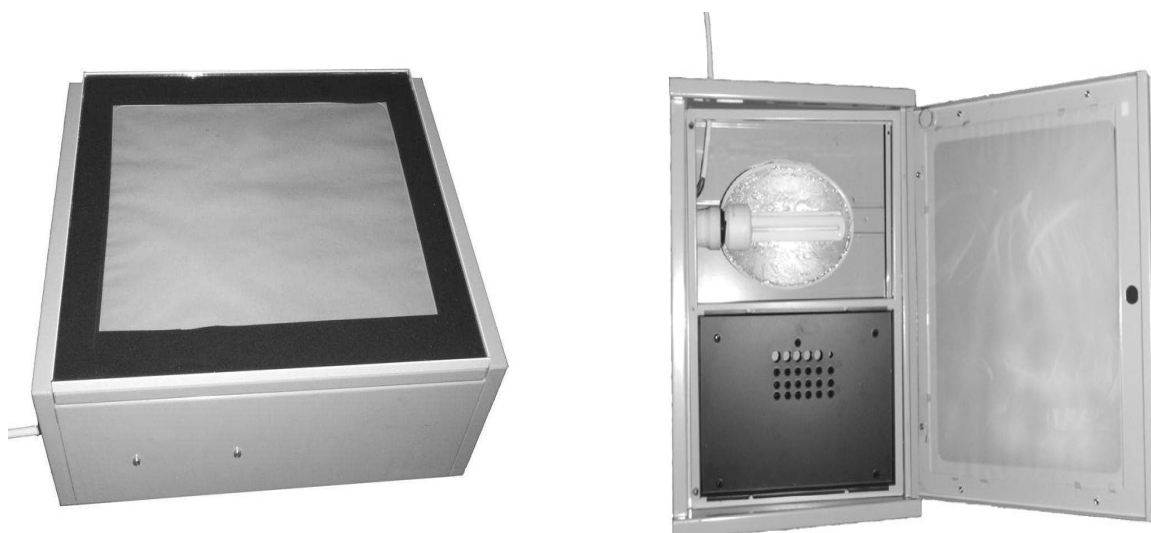


Fig. 2 - Transilluminatore di campo utilizzato nell’indagine



Fig. 3 – Esame visivo dei filetti di persico al transilluminatore

I filetti in cui veniva evidenziata la presenza di parassiti venivano raccolti e sottoposti a procedure volte ad isolare i parassiti, che venivano subito fissati in alcool etilico 70° in modo da mantenerne la condizione contratta necessaria ai fini dell'identificazione morfologica di specie (sia al microscopio ottico che al Microscopio Elettronico a Scansione, SEM) e rendere possibile la conduzione di analisi molecolari. Alcuni parassiti venivano fissati in formalina tamponata al 10% per la conduzione di successivi esami istologici.

Tutte le osservazioni venivano annotate su una scheda appositamente preparata (Allegato II).

I valori di prevalenza ed intensità d'infestazione sono stati intesi nel senso di Bush *et al.* (1997).

Diversamente, la ricerca di larve plerocercoidi in luccio e bottatrice è stata condotta analizzando la cavità viscerale, sito d'elezione per il parassita in queste specie ittiche, seguendo le procedure specifiche indicate nella SOP MIPAV ITT 10.01.02 (vedi Allegato I).

Infine, allo scopo di raccogliere informazioni sui casi umani di Difillobotriasi diagnosticati sul territorio del lago di Como nel periodo d'indagine, si sono instaurate collaborazioni con il Dr. Terramocci ed il Dr. Vaiani che operano

rispettivamente presso l'ospedale Valduce di Como e Manzoni di Lecco, e che risultavano fa gli autori di lavori specifici sull'argomento.

2.2.3 TECNICHE DI IDENTIFICAZIONE

L'identificazione di specie su base morfologica è stata effettuata applicando tecniche parassitologiche classiche (studio morfometrico al microscopio ottico ed esame istologico) e moderne (osservazione al SEM) presso l'Istituto di Parassitologia dell'Accademia delle Scienze di Ceske Budejovice, Repubblica Ceca, durante il periodo di formazione/ricerca condotto all'estero. Per l'identificazione sono state utilizzate chiavi tassonomiche specifiche (Andersen *et al.*, 1987; Andersen e Gibson, 1989; Hoffman, 1999)

Per quanto riguarda l'identificazione su base molecolare, 7 larve plerocercoidi (6 da persico e 1 da luccio) isolate nel corso dell'indagine sono state sottoposte a Polymerase Chain Reaction (PCR) e successivo sequenziamento, seguendo in parte le indicazioni di Wicht *et al.*, 2007. Vengono qui di seguito descritte le modalità di esecuzione della PCR

Le larve plerocercoidi precedentemente fissate in alcool 70° sono state sottoposte a tre lavaggi in 500 µl di TE, mediante centrifugazione a *full speed* per 1'. Si è proceduto quindi all'estrazione del DNA genomico mediante kit del commercio (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) seguendo il protocollo riportato dal produttore, con alcune modifiche qui riportate:

- × ogni lavaggio è stato condotto a *full speed*;
- × è stata omessa la fase di digestione dell'RNA;
- × l'eluizione è stata condotta con 100 µl di buffer AE, preriscaldato a 70°C.

Gli estratti sono stati sottoposti ad amplificazione mediante PCR. Per la messa a punto della tecnica sono state condotte diverse PCR i cui parametri sono stati modificati fino al raggiungimento dell'obiettivo, l'amplificazione del DNA della larva plerocercide.

I primers impiegati nelle prove preliminari sono stati 82F (5'-CAG TAG TCA TAT GCT TGT CTC AG-3') e 81R (5'-TTC ACC TAC GGA AAC CTT GTT ACG-3') (Mariaux, 1998) che amplificano un frammento di circa 2500 bp del 18S rDNA.

La mix di reazione era così costituita (Wicht *et al.*, 2007):

- × MgCl_2 1.5 mM
- × dNTPs 200 μM
- × 15 pmol/ μl di ciascun primer \rightarrow 0,3 μM
- × Taq polimerasi 2,5 U (*Taq recombinant* - Invitrogen)
- × 2 μl di DNA

Il termociclatore (Tpersonal, Biometra) è stato così programmato: denaturazione iniziale di 2' a 94°C; 35 cicli: 30''/94°C, 40''/45°C, 1.30''/72°C seguiti da un'estensione finale di 5' a 72°C.

Si è quindi proceduto all'esecuzione di un'eminested PCR per aumentare la specificità di amplificazione, impiegando nel primo round i primers 82 F e 81 R (le cui sequenze fiancheggiano l'intero gene 18S) e nel 2° round i primers 82 F e 84R (5'-TCC TTT AAG TTT CAG CTT TGC-3') che amplificano un frammento di circa 1500 bp.

In questa seconda prova la mix di reazione era così costituita

- × MgSO_4 1,5 mM
- × dNTPs 200 μM
- × 15 pmol/ μl di ciascun primer \rightarrow 0,3 μM
- × *Taq platinum* 2,5 U (Invitrogen)
- × 5 μl di DNA nel 1° round
- × 1 μl nel 2° round

Tutti gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1% in 0.5X TBE Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato analizzato mediante Safe Imager (Invitrogen).

I campioni risultati positivi all'amplificazione sono stati inviati al servizio di sequenziamento (PRIMM, Milano); le sequenze ottenute sono state corrette ed assemblate mediante il software VectorNT Advance 10.0 (Invitrogen) e quindi comparate con quelle depositate in GenBank mediante il software BLAST.

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1. INDAGINI IN SPECIE ITTICHE

Nella tabella 2 sono riportati, per ogni anno d'indagine e per ogni stazione di campionamento, i risultati degli esami parassitologici condotti nei pesci persico per la ricerca di larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp., con relativi valori di percentuale di positività ed intensità d'infestazione.

Tabella 2 – Percentuale di positività ed intensità d'infestazione per larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp. nei pesci persico esaminati nel periodo 2005-2007

	N pesci esaminati	N pesci positivi	Percentuale di positività (%)	Intensità d'infestazione
2005				
Bellagio	53	14	26,4	1,14
Mandello del Lario	50	19	38,0	1,16
Carate Urio	71	15	21,1	1,27
Domaso	41	18	43,9	1,28
Totale/media	215	66	30,7	1,21
2006				
Bellagio	55	15	27,3	1,07
Mandello del Lario	52	15	28,8	1,20
Carate Urio	52	14	26,9	1,27
Domaso	51	24	47,1	1,46
Totale/media	210	68	32,4	1,25
2007				
Bellagio	-	-	-	-
Mandello del Lario	33	5	15,1	1,00
Carate Urio	50	10	20	1,20
Domaso	50	20	40	2,15
Totale/media	133	35	26,3	1,29
Totale complessivo	558	169	30,3	1,25

Per quanto concerne il lago di Como, oltre ai 558 pesci persico si sono esaminati 4 soggetti di luccio, 6 soggetti di bottatrice e i 22 esemplari di lavarello. Tra questi, solo 2 lucci sono risultati positivi per la presenza di larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp. a livello della cavità viscerale, mentre tutti gli altri soggetti sono risultati negativi.

I soggetti prelevati nel corso dei campionamenti condotti nel primo anno d'indagine presso il Lago d'Orta (35 soggetti di pesce persico) ed il Lago d'Iseo (37 soggetti), sono risultati sempre negativi per larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp.

Anche l'esame parassitologico per la ricerca di larve plerocercoidi condotto su 30 trote iridee d'allevamento provenienti dalla provincia di Trento ha dato esito negativo.

Il valore di percentuale di positività medio osservato nei pesci persico del Lago di Como esaminati nei tre anni d'indagine si attesta intorno a 30,3%, valore molto più elevato rispetto a quello osservato da Borroni e Grimaldi nel 1973 (16%) e nettamente maggiore rispetto a quello riportato in altri ambienti lacustri prealpini, quale ad esempio il Lago Maggiore, dove si è rilevata una prevalenza del 7,8% nel 2004 da parte di Dupouy-Camet e Peduzzi e rispettivamente del 14,1% e 13,1% in due anni d'indagine da parte di Wicht *et al.* (2006; 2007a)

Anche nel Lago di Ginevra l'ultima indagine effettuata da Nicolaud *et al.* (2005) ha rilevato una prevalenza nei persici del 6% nel 2003, del 7% nel 2004 e dell'8% nel 2005, sensibilmente inferiore rispetto a quanto da noi riscontrato nel Lago di Como.

I valori di intensità d'infestazione, di poco superiori a 1, sono risultati invece in linea con quanto riportato in letteratura (Borroni e Grimaldi, 1973).

Nettamente contrastante con quanto indicato da Dupouy-Camet e Peduzzi (2004) è invece la negatività da noi riscontrata nel Lago d'Orta, dove in precedenza era stata rilevata in pesce persico una prevalenza del 33,3% (Peduzzi e Boucher-Rodoni, 2001). Va però evidenziato come nella nostra indagine sia stato esaminato un campione piuttosto esiguo (35 esemplari)

prelevato solo nel primo anno di ricerca, richiedendo quindi ulteriori approfondimenti.

Per quanto riguarda le trote analizzate e risultate negative, il dato ottenuto su 30 esemplari, pur non significativo, rappresenta un punto di partenza per la valutazione del rischio della presenza di parassiti zoonosici in realtà di allevamento sul nostro territorio. Nonostante in letteratura sia riportato qualche episodio epidemico di Difillobotriasi in salmonidi allevati in Cile (Torres, 2002; Cabello, 2007), in Scozia (Wootten e Smith, 1979), in Irlanda (Rodger, 1991) e in Finlandia (Rahkonen *et al.*, 1996), va innanzitutto evidenziato come l'agente eziologico in questi casi appartenesse alle specie *D. dendriticum* e *D. ditremum*, al momento non segnalati in Italia, inoltre le realtà di troticoltura in Italia, prevalentemente di tipo intensivo, e il tipo di gestione che ne deriva, sembrano in grado di impedire che il ciclo biologico di questo tipo di parassiti a ciclo complesso possa instaurarsi in modo stabile.

Dal punto di vista diagnostico il rilevamento delle larve di *Diphyllbothrium* spp. non ha presentato generalmente grosse difficoltà, in quanto quelle localizzate vicino alla superficie di taglio risultano piuttosto evidenti sia per le loro ragguardevoli dimensioni (0,5-1 cm) sia per il loro colore bianco-latte che contrasta in genere con il colore grigio rosato del filetto (Fig. 4 e 5).



Fig.4 – Esempio di filetto con in evidenza una larva pleroceroide



Fig. 5 - Larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp. in condizioni di osservazione normale quando ancora incistata, al transilluminatore ed excistata dal muscolo

Più indaginosa è risultata invece l'individuazione delle larve plerocercoidi situate in profondità nel muscolo, condizione in cui l'uso del transilluminatore si è rivelato fondamentale soprattutto in quelle situazioni di campo che prevedevano condizioni di luce non ottimali (Fig. 6).



Fig. 6 - Esempio di larva plerocercoide situata nello spessore del muscolo ed evidenziabile con l'ausilio del transilluminatore

Per poter facilitare la conduzione della diagnosi differenziale è molto importante effettuare le operazioni di eviscerazione evitando di rompere l'intestino, in quanto in questa sede è frequente il reperimento di esemplari di acantocefali ed altri elminti che possono essere confusi all'esame visivo con larve plerocercoidi.

Inoltre bisogna sempre tenere presente la possibile localizzazione muscolare di larve plerocercoidi di altre specie di cestodi Pseudophyllidea non zoonosici (per esempio *Triaenophorus crassus*) che macroscopicamente non sono facilmente distinguibili dalle larve di *Diphyllbothrium* spp.

Questi stadi larvali si rinvencono comunque soprattutto in ospiti salmonidi e possono essere identificati in base alla presenza di caratteristici uncini a livello dello scolice.

Sempre a livello muscolare, nei teleostei selvatici è frequente il reperimento di cisti contenenti spore di parassiti Myxozoa (*Henneguya* spp., *Myxobolus* spp.). Sebbene all'esame macroscopico queste formazioni cistiche possano essere confuse con le larve plerocercoidi, all'esame microscopico risultano facilmente identificabili per la presenza delle caratteristiche spore (Fig. 7).

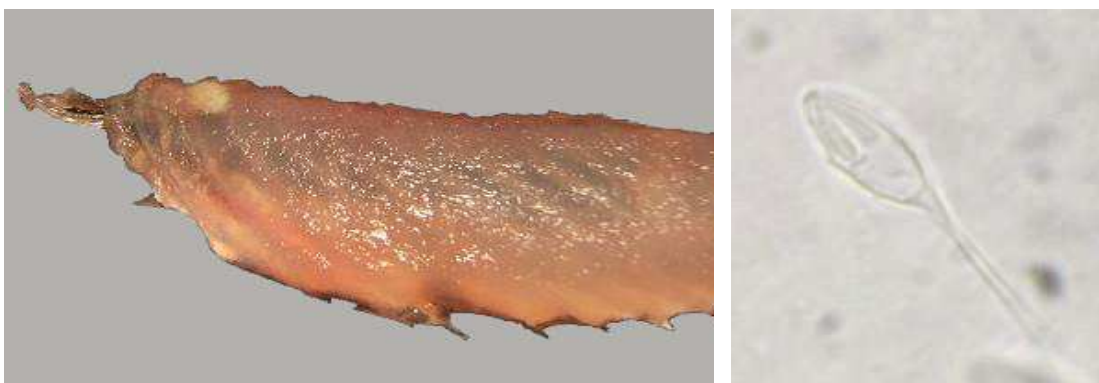


Fig. 7 – Cisti muscolare contenente spore di *Henneguya* spp. in pesce persico.

Molte specie ittiche sono state descritte quali ospiti intermedi idonei di *D. latum* nelle diverse zone geografiche, talvolta con alcune incongruità. Per quanto riguarda l'Europa continentale sono sicuramente almeno quattro le specie ittiche idonee allo sviluppo delle larve plerocercoidi di *D. latum*: il pesce

persico (*Perca fluviatilis*), l'acerina (*Acerina cernua*), il luccio (*Esox lucius*) e la bottatrice (*Lota lota*) (Borroni e Grimaldi, 1973).

Alcuni autori vi aggiungono il salmerino (*Salvelinus alpinus*) (Schiavo, 1997). Secondo alcuni autori i Salmonidi appartenenti al genere *Salmo* non sarebbero idonei, mentre secondo altri potrebbero esserlo (Morishita *et al.*, 1973; Woo, 1996).

In Nord America si segnalano, fra gli ospiti intermedi idonei, il luccio (*Esox lucius*), due specie di lucioperca (*Stizostedion vitreum*, *S. canadense griseum*), l'omologo del pesce persico europeo (*Perca flavescens*) e della bottatrice (*Lota maculosa*) (Woo, 1996).

Per quanto attiene le coste del pacifico, si segnalano varie specie appartenenti al genere *Oncorhynchus* (tra queste *O. masu*, *O. gorbuscha*, *O. keta*, *O. nerka*). In nessun continente sono segnalati i Ciprinidi quali ospiti intermedi idonei (Dupuoy-Camet e Peduzzi, 2004; Woo, 1996; Williams e Jones, 1994).

In Italia fin dal 1894 Parona accertò, analizzando specie ittiche presenti nei laghi prealpini, una elevata presenza di larve plerocercoidi da *D. latum* e le mise in relazione con l'elevata frequenza di difillobotriasi umana osservata in popolazioni rivierasche del lago di Varese. Lo stesso autore nel 1894 indicò il pesce persico ed il luccio fra le specie ittiche più frequentemente ospiti di larve plerocercoidi del parassita, così come successivamente indicato anche da Borroni e Grimaldi (1974). I risultati delle nostre indagini hanno confermato questi dati, perlomeno relativamente al lago di Como.

2.3.2. IDENTIFICAZIONE DELLE LARVE PLEROCERCOIDI

L'identificazione di specie delle larve plerocercoidi su base morfologica presenta alcune difficoltà correlabili alla mancanza di strutture anatomiche caratteristiche a livello dello scolice, ad eccezione delle botrie, e di qualsiasi carattere morfologico legato all'apparato riproduttivo ed alle proglottidi così importanti da un punto di vista tassonomico nei cestodi adulti.

Il genere *Diphyllbothrium* comprende inoltre specie molto simili tra loro (Stunkard, 1965; Meyer, 1966; Woo, 1996) ed i criteri morfologici impiegati si rivelano a volte insufficienti per l'identificazione a livello di specie dello stadio larvale plerocercioide.

La chiave d'identificazione su criteri di tipo morfologico proposta da Andersen e Gibson (1989) risulta articolata in 4 fasi, come viene schematizzato nella tabella sottostante (Tabella 3), ed è stata utilizzata in questa indagine in quanto strumento tassonomico valido per l'identificazione delle specie europee del genere *Diphyllbothrium*, sebbene richieda la conduzione parallela di tecniche microscopiche (al microscopio ottico ed al SEM) ed istologiche.

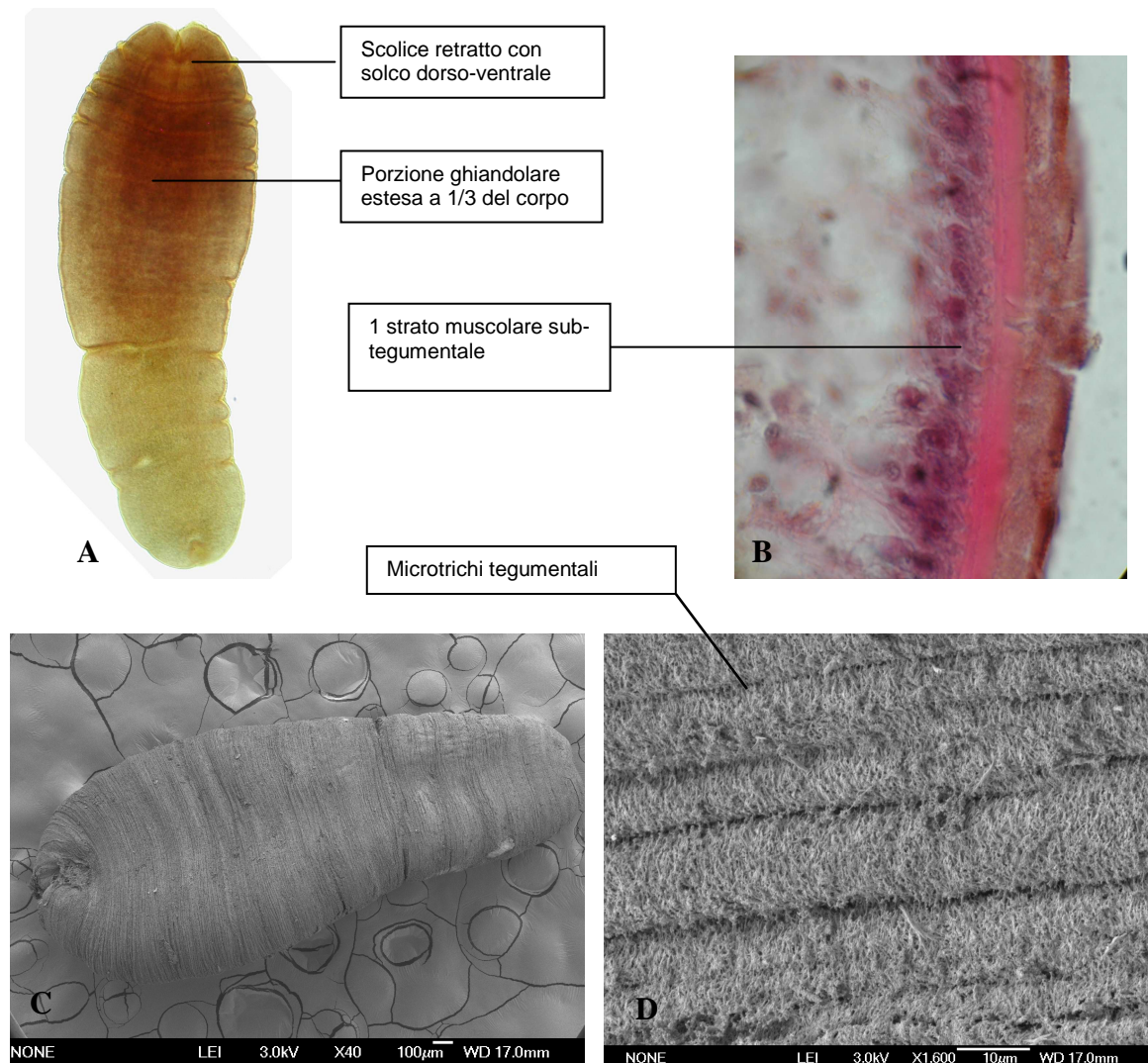
Tabella 3 – Chiave tassonomica proposta da Anderson e Gibson (1989) per l'identificazione di larve plerocercoidi appartenenti alle tre specie europee del genere *Diphyllbothrium*.

SPECIE	<i>D. latum</i>	<i>D. ditremum</i>	<i>D. dendriticum</i>
I - OSSERVAZIONE MORFOLOGICA AL MICROSCOPIO			
Ospite pesce	Persico, luccio, bottatrice, lucioperca	Salmonidi	Salmonidi
Scolice	Retratto, non visibile	Estroflesso, conico	Parzialmente retratto
Morfologia del corpo	Estremità anteriore con solco dorso-ventrale	Non segmentato	Primordi genitali
Superficie corporea	Corrugata trasversalmente	Liscia o leggermente corrugata	Fortemente corrugata
II – DIMENSIONI E LOCALIZZAZIONE			
Lunghezza	Minore di 5 cm	Minore di 2,5 cm	10-12cm
Localizzazione	Muscolatura o cavità viscerale, libero	Cavità addominale, incistato	Parete dello stomaco e intestino, incistato
III – OSSERVAZIONI AL SEM			
Microtrichi (lunghezza)	2 µm	12-30 µm	7-12 µm
IV – OSSERVAZIONI ISTOLOGICHE			
Ghiandole cefaliche	Estese a 1/3 del corpo	Solo nello scolice	Solo nello scolice
Muscoli sub-tegmentali	1 strato di fibre	2-5 strati	1-2 strati muscolari

In base all'utilizzo delle metodiche parassitologiche indicate nella chiave tassonomica di Anderson e Gibson (1989), tutte le larve plerocercoidi da noi reperite in pesce persico e luccio sono state identificate come appartenenti alla specie *Diphyllbothrium latum*.

Nella tavola seguente vengono riportate alcune immagini relative alle principali caratteristiche morfologiche utilizzate per l'identificazione delle larve plerocercoidi (Tavola 1).

Tavola 1. Caratteri tassonomici utilizzati per l'identificazione delle larve plerocercoidi in preparati a fresco (A), sezioni istologiche (B), SEM (C e D).



Da notare come solo lo studio approfondito e sinergico di tutti i caratteri morfologici ed anatomici proposti da Andersen e Gibson (1989) abbia permesso di raggiungere con ragionevole sicurezza l'identificazione di specie.

In base alla nostra esperienza l'aspetto del tegumento (fig. 8 A) delle larve ed il grado di estroflessione dello scolice (fig. 8 B), seppur piuttosto generici, costituiscono caratteri di rapida ed efficace tipizzazione per un occhio esperto, anche se i diversi fattori che influiscono su questi caratteri sono così numerosi (dalle modalità di isolamento a quelle di fissazione, solo per fare un esempio) da non consentire mai l'utilizzo di questi fattori per un'identificazione di specie.

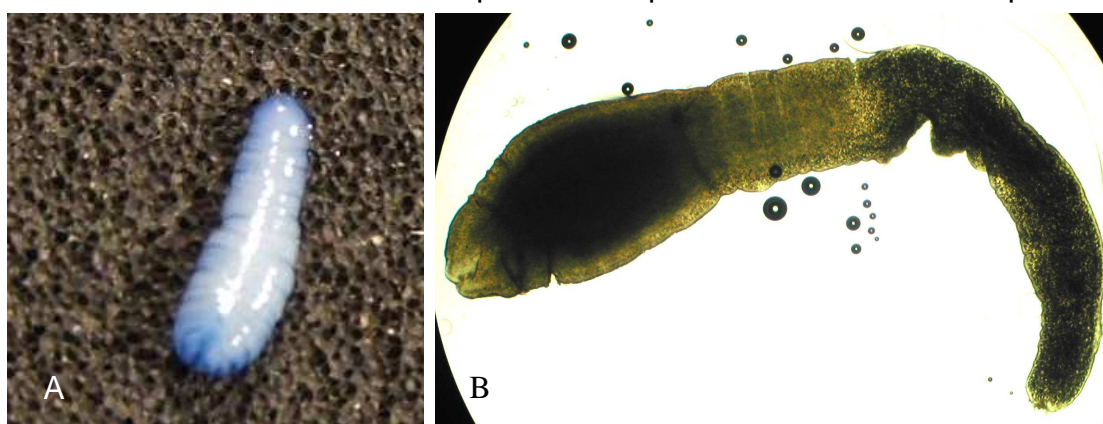


Fig. 8 - larve plerocercoidi di *D. latum*: A) esemplare colorato con blu di lattofenolo per evidenziare l'aspetto della superficie corporea; B) esemplare allo stereo microscopio.

Per ogni larva rinvenuta è stata presa nota della sua localizzazione su un disegno stilizzato di filetto. Le larve si posizionano preferenzialmente nella parte superiore dello stesso ed in particolar modo nella sua parte anteriore ed in quella mediana come già evidenziato da Borroni e Grimaldi, 1974 (fig. 9).

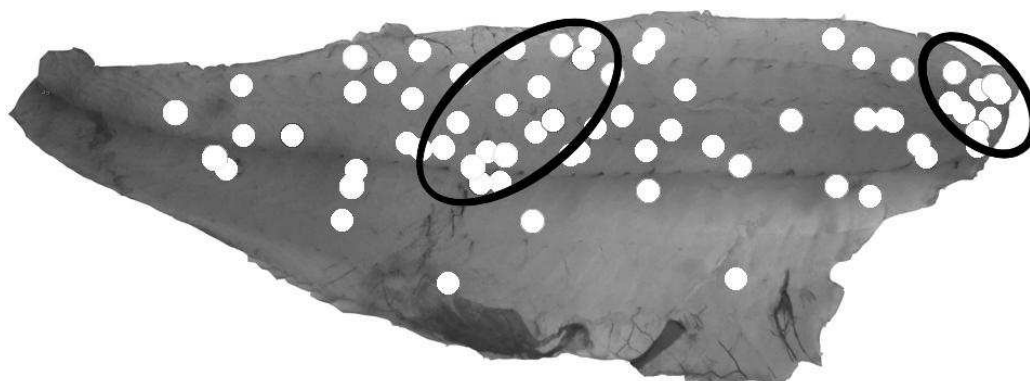


Fig. 9 - Rappresentazione schematica della localizzazione delle larve plerocercoidi nei filetti di persico

Negli ultimi anni sono state messe a punto e largamente impiegate tecniche molecolari che hanno contribuito notevolmente a far luce sulla tassonomia di questo genere (Wicht *et al.*, 2006; Yera *et al.*, 2006; Wicht *et al.*, 2007) e dell'intero ordine degli Pseudophyllidea, che finora comprendeva circa 60 generi e più di 400 specie e che, in base alla proposta di alcuni autori (Brabec *et al.*, 2006), dovrebbe ora venire diviso in due gruppi (*clades*) geneticamente differenti: Bothriocephalidea e Diphyllbothriidea, cui apparterebbe il genere *Diphyllbothrium*.

Questa revisione tassonomica era già stata proposta in passato (Bray *et al.*, 1999), ma solo lo sviluppo delle moderne tecniche molecolari applicate alla filogenesi dei parassiti ha permesso di dare completezza scientifica a queste teorie e di consentire la collocazione tassonomica di alcune famiglie di cestodi finora ritenute *incertae sedis*.

Per quanto riguarda la diagnosi su base molecolare, con il primo protocollo di PCR, che impiegava i primers 82F-81R, solo un campione su 7 è risultato debolmente positivo.

L'impiego dell'eminested PCR (primers 82F-81R e 82F-84R) ha permesso invece l'amplificazione di tutti i campioni in esame, come evidenziato nella figura a fianco.



I 7 campioni morfologicamente identificati come *Diphyllbothrium* spp. e sottoposti a conferma molecolare hanno mostrato una banda identica di circa 1200 bp. La discriminazione è stata possibile solo dopo l'analisi delle sequenze mediante BLAST.

Di seguito vengono riportate rispettivamente una delle sequenze di *Diphyllbothrium* spp. ottenute (1229 bp) mediante eminested PCR, cui segue il risultato dell'analisi con BLAST. Come si può osservare la nostra sequenza mostra un'identità del 100% con *Diphyllbothrium latum*.

1	TGCACGCTT CATACGGTGA AACCGCGAAT GGCTCATTAA ATCAGCTATG GTTTATTGGA TCATACCCGT TAAATGGATA ACTGTAATAA CTCTAGAGCT
101	AATACATGCC CCGAAGCCCT GACCCGCGAG GGAATGGGTG CACTTATTAG ATCAGAAGCC AACCAGGTAG TGTCTCTCG CTTTCGGGTG GGAGCTCCGC
201	TGCCTGTCTG CTTCTGGTG ACTCTGGATA ATTGTTACAG ATCGCAGTCG GCCTTGGCTC GCGACGGGT CTTTCAAATG TCTGCCCTAT CAACCTTCGA
301	TGGTAGGTGA CCGCTCTACC ATGGTGATAA CGGGTAACGG GGAATCAGGG TTGATTCCG GAGAGGGAGC CTGAGAAACG GCTACCACCT CCAAGGGAGG
401	CAGCAGGCGC GCAAAATTACC CACTCCCACT ACGGGGAGGT GGTGACGAAA AATACCGATG CGGGACTCTT ATTGAGGCTC CGTAATCGGA ATGAGTGAAC
501	TCTAAATCCT TTCACGAGGA TCAATTGGAG GGCAAGTCTG GTGCCAGCAG CCGCGGTAAC TCCAGCTCCA ATAGCGTATA TTAAAGTTGC TGCAGTTAAA
601	AAGCTCGTAG TTGATCTCG GTATCACTGT CGCCTGCCAG TCCTGGGCTG ATTGTGTCTG TGTGTGTAGG TGGGACCGTG CTCTGCGCGG CACCCCTCGC
701	CCAGGCGCGG TTATGCTCGA GTTGGCGTGG TGGTGGTGTG ACCTTTCAGC CATGTCTGTG GTGAAATACC CGCAGGTGTA GCGAGTGTG AGGCGGTGCT
801	CTGCGACAGT AGGGTCCGTC GGCTCGTTTG CATGCCTCTG GATGCCCTTC AAAAGGTGTC TATGGGCGGA TGGCACGTTT ACTTTGAACA AATTGAGTGA
901	CTCAAACAG CGCGATGTTG CCTGAAAAGT TTTGCATGGA ATAATGGAAT AGGACTTCGG TTCTATTTCG TTGGTTTTCG GATCCGAAAT AATGATCAAA
1001	AGAGACAGCG GGGGACGTTT GTATGGTTGC GCTAGAGGTG AAATTCATGG ACCGTAACCA GACAACTAA AGCGAAAGCA TTCGTCAAGC ATGTTTTCAT
1101	TGGCCATGAG CGAAAGTCAG AGGCTCGAAG ACGATCAGAT ACCGTCTAG TTCTGACCAT AAACGATGCC AACTGACGAT CCGTGGTGGT AGTATTTTAA
1201	CCATCCCCAC GGGCAGTCCC CGGGAACCC

Sequenza di *Diphylobothrium latum*

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 115605641 DQ925309.1	Diphylobothrium latum 18S ribosomal RNA gene, complete s	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114146002 DQ768159.1	Diphylobothrium latum isolate FD 18S ribosomal RNA gene, i	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114146001 DQ768158.1	Diphylobothrium latum isolate LF 18S ribosomal RNA gene, f	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114146000 DQ768157.1	Diphylobothrium latum isolate ADB 18S ribosomal RNA gene	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114145999 DQ768156.1	Diphylobothrium latum isolate BW2 18S ribosomal RNA gene	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114145998 DQ768155.1	Diphylobothrium latum isolate BW1 18S ribosomal RNA gene	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114145997 DQ768154.1	Diphylobothrium latum isolate JDC04.04 18S ribosomal RNA	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114145996 DQ768153.1	Diphylobothrium latum isolate JDC02.04 18S ribosomal RNA	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 114145995 DQ768152.1	Diphylobothrium latum isolate JDC11.03 18S ribosomal RNA	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 74048812 DQ181942.1	Diphylobothrium latum isolate AG from France 18S ribosome	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 74048803 DQ181941.1	Diphylobothrium latum isolate JN02.05 from Perca fluviatilis	2270	2270	100%	0.0	100%
gi 83588825 DQ316793.1	Diphylobothrium latum clone 1 18S ribosomal RNA gene, cor	2270	2270	100%	0.0	100%

D. latum con BLAST

Ad ulteriore conferma sono stati inviati alla Dott.ssa Wicht dell'Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona, Svizzera, alcuni campioni che sono stati anche in questo caso identificati come appartenenti alla specie *D. latum*.

L'impiego della sola PCR non ha permesso di stabilire la loro esatta posizione tassonomica, risultato raggiunto solo con il sequenziamento; ne deriva che attualmente l'applicazione di questa tecnica diagnostica a livello routinario sia utilizzabile per l'identificazione di specie solo se seguita da sequenziamento dei prodotti di PCR.

La messa a punto di una PCR-RFLP o l'impiego di primers altamente specifici potrebbe permettere in futuro di condurre PCR diagnostiche in modo rapido ed economico, con vantaggi enormi per il raggiungimento dell'identificazione a livello di specie delle uova e delle proglottidi reperite nelle feci dell'ospite definitivo (Wicht *et al.*, 2007) e per la conduzione di studi epidemiologici sugli ospiti intermedi che albergano gli stadi larvali proceroidi e plerocercoidi del parassita.

Le metodiche molecolari assumono inoltre una crescente importanza alla luce delle massive importazioni di prodotti ittici da paesi terzi in cui sono segnalate specie del genere *Diphyllbothrium* esotiche per il territorio nazionale.

2.3.3. DIFILLOBOTRIASI UMANA

I contatti intrapresi con gli ospedali Valduce di Como e Manzoni di Lecco fin dall'inizio del 2005 hanno permesso di raccogliere i dati relativi ai casi umani di Difillobotriasi diagnosticati in queste strutture ospedaliere nel corso di indagini coproparassitologiche di routine a partire dal 2002, successivamente quindi ai 6 casi registrati nel solo ospedale di Lecco nel 2001 (Terramocci *et al.*, 2001).

In tabella 4 vengono riportati tutti i casi di Difillobotriasi umana registrati sul lago di Como nel periodo 2002-2007.

Tabella 4 – Casi umani di Difillobotriasi descritti nell'areale del Lago di Como tra il 2002 ed il 2007 (U = uova; P = proglottidi).

Anno	Caso	Età	Località	Stadio parassitario	Note anamnestiche
2002	1	39	Suello (LC)	U	-
	2	45	Abbadia Iariana	U	-
2003	3	-	Oliveto Iariano	U, P	-
	4	-	Primaluna (LC)	-	-
	5	51	Introbio	U	Pesce persico (mercato ittico)
	6	46	Lecco	U, P	Coregone (ristorante)
2004	7	-	-	U	-
	8	-	-	U	-
2005	9	-	Bellano	U	Coregone (mercato)
	10	-	Bellano	U	Filetto di persico
	11	-	Lecco	U, P	Persico e Coregone
	12	5	Lecco	U	Persico (asilo)
	13	55	Bellano	U	Persico e coregone
	14	30	-	-	Pesce di lago
2006	15	51	Lecco	U, P	-
	16	19	Pescate(LC)	U	-
	17	61	Lecco	U	-
2007	18	60	Lecco	U	-
	19	78	Mondello Iario	U, P	-
	20	34	Galbiate (LC)	U	-

A questi va aggiunto un caso diagnosticato alla fine del 2007 presso il laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Perugia in un paziente che aveva soggiornato in una località sul Lago Maggiore e che aveva consumato carpaccio di pesce di lago. In questo caso è stato possibile ottenere, dopo trattamento con praziquantel, un segmento del cestode di notevole lunghezza sulla cui analisi morfologica si è basata la conferma diagnostica già avanzata sulla base delle uova reperite nelle feci e dell'anamnesi (Crotti, comunicazione personale).

In base ai reperti coproparassitologici ed alle informazioni anamnestiche ottenute, i casi umani sopra elencati sono stati tutti imputati a *Diphyllobothrium*

latum, unica specie al momento segnalata in Italia. Va però evidenziato come a livello mondiale tra le specie d'interesse in sanità pubblica siano da annoverare, anche *D. pacificum*, segnalato in Sud America (Santos e De Faro, 2005) e solo recentemente confermato quale specie valida (Škeřikova *et al.*, 2006), *D. dendriticum*, *D. ditremum* e *D. nihonkaiense*. Esistono inoltre altre specie di minore importanza zoonosica quali *Diphyllbothrium cameroni* (Miyazaki, 1991), *D. parvum* (Miyazaki, 1991) e *D. yonagoensis* (Miyazaki, 1991). Nella Tabella 5 vengono riportate le specie di reale o potenziale interesse zoonosico.

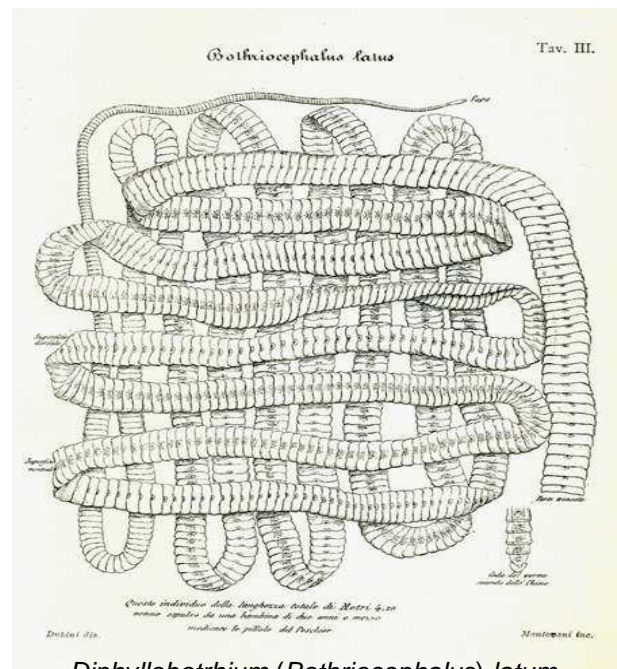
Tabella 5 – Specie del genere *Diphyllbothrium* e loro carattere zoonosico

Genere <i>Diphyllbothrium</i>	Riferimento bibliografico												
Specie	Wicht <i>et al.</i> (2007)	Scaglia M. <i>et al.</i> (in corso di pubbl.)	Dupuoy-Camet J., Peduzzi (2004)	Tolonen (2000)	Bonini, <i>et al.</i> (1998)	Lou <i>et al.</i> (1989)	Schiavo (1997)	Woo. (1996)	Williams e Jones (1994)	Miyazaki (1991)	Monishta K. <i>et al.</i> (1973)	Phyllis e Fraser (1960)	Parona (1894)
<i>cameroni</i> (m)										x			
<i>colymbi</i>									x				
<i>cordatum</i>		x							x				
<i>dalliae</i>		x							x				
<i>dendriticum</i>		x		x					x				
<i>ditremum</i>									x				
<i>giliacicum</i>									x				
<i>lanceolatum</i>		x							x				
<i>latum</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
<i>luxi</i>									x				
<i>nihonkaiense</i>	x					x							
<i>pacificum</i> (m)		x					x		x	x			
<i>parvum</i>											x		
<i>skrjabini</i>									x				
<i>theileri</i>									x				
<i>trinitatis</i>									x				
<i>ursi</i>									x				
<i>vogeli</i>									x				
<i>yonagoensis</i> (m)		x								x			

(legenda): Specie descritte di *Diphyllbothrium*. Le “x” con sfondo grigio scuro sono evidenziate le specie segnalate come aventi ospite definitivo idoneo l’uomo, in grigio chiaro quelle da valutare come potenziali agenti zoonosici. Con la (m) le specie marine.

La prima descrizione di questa parassitosi nell'uomo risale al 1747 in Finlandia (von. Bonsdorff, 1977), subito correlata al consumo di pesce poco cotto o crudo. Si hanno comunque prove dell'esistenza della patologia da millenni, come dimostrato dal rinvenimento di uova del parassita in feci fossili prelevate da siti neolitici in Europa (Peduzzi e Boucher-Rondoni, 2001).

Per quanto concerne l'Italia, Parona (1894) e Perroncito (1901) fin dalla seconda metà dell'Ottocento riportarono numerosi casi umani sostenuti da *D. (Bothriocephalus) latum*. Parona (1894) per primo pose in relazione l'elevata diffusione delle larve plerocercoidi di *D. latum* in specie ittiche lacustri con la diffusione della parassitosi in popolazioni rivierasche dell'Italia settentrionale. Perroncito (1901) diede qualche indicazione sulle elevate prevalenze della parassitosi nell'uomo nelle aree occidentali della Svizzera, con oltre un quarto della popolazione di Ginevra infestata dal parassita.



A livello mondiale, fino a circa trent'anni fa i casi d'infestazione umana da *D. latum* venivano valutati intorno ai 5 milioni in Europa, 100.000 in America e 4 milioni in Asia (Schiavo, 1997).

L'importanza di questa parassitosi ittica in sanità pubblica era ancora ampiamente riconosciuta nella prima metà del Novecento, tanto che venne inserita nel Regolamento di Polizia Veterinaria del 1954 quale malattia dei pesci soggetta a denuncia.

Nonostante l'applicazione di piani di controllo e profilassi, basati essenzialmente su sistemi di canalizzazione fognaria e depurazione delle acque luride, volti ad impedire l'introduzione nelle acque libere delle uova del

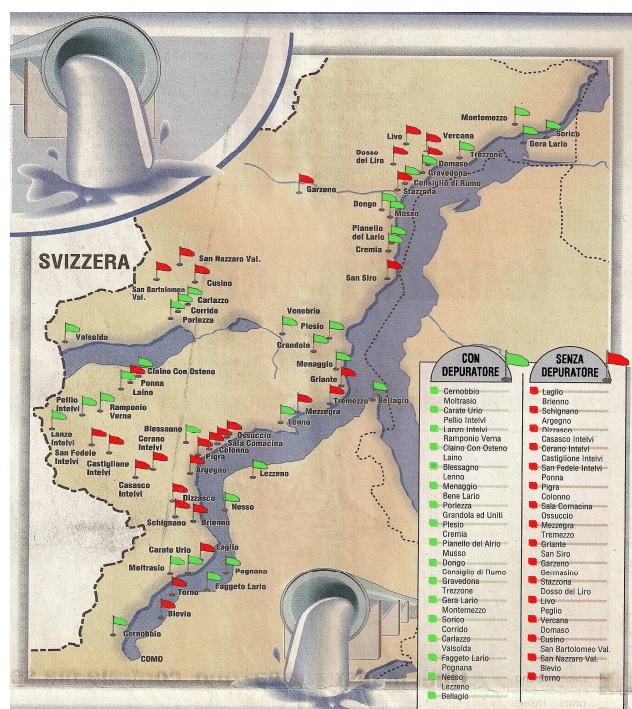
parassita eliminate con le feci dall'ospite definitivo, abbia permesso di ridurre enormemente la diffusione di questa parassitosi, non si è mai giunti ad una completa eradicazione dal territorio nazionale, come dimostrato dai casi umani individuati sul Lago di Como dal 2002 al 2007 (Tabella 3), cui si aggiungono quelli relativi agli altri laghi sub-alpini presenti sul territorio svizzero e francese (Dupuoy-Camet e Peduzzi, 2004).

Questo dato è spiegabile con la presenza di alcuni punti critici che favoriscono il mantenimento dello stato di endemia della parassitosi in un determinato ambiente:

- presenza di ambienti acquatici idonei in zone a clima temperato, quali ad esempio i laghi sub-alpini. Restano da chiarire le ragioni per cui la parassitosi non abbia mai raggiunto i laghi dell'Italia centrale, le cui caratteristiche idrogeologiche non sembrano discostarsi in modo significativo da quelle delle aree endemiche, e non sia mai stata segnalata nei laghi subalpini dell'Austria;

- contaminazione fecale delle acque interne, che continua ad essere un

problema nella maggior parte dei laghi italiani, tra cui anche quello di Como. La presenza del parassita è, infatti, un indicatore di elevata fecalizzazione di un bacino idrico (Dupuoy-Camet e Peduzzi, 2004). Come si evince dalla figura a lato, fornita dalla provincia di Como, i depuratori dichiarati funzionanti lungo le rive del lago sono circa la metà di quelli esistenti. Al momento attuale sembra che le Autorità



competenti abbiano preso coscienza di tali problematiche e siano stati stanziati ingenti fondi per valutare la situazione ed individuare metodi di risanamento microbiologico (Progetto Plinius, 2006), sebbene il “problema difillobotriasi” non

venga preso in alcuna considerazione. Per il momento sono previste soluzioni a breve termine, in cui si prospetta l'utilizzo di un agitatore meccanico che permetta la movimentazione delle colonne d'acqua ed una maggiore dispersione degli inquinanti superficiali, fonte di preoccupazione per l'"inesteticità" che ne derivano a causa delle conseguenti proliferazioni batteriche ed algali. Appare abbastanza evidente come questo possa rappresentare un sistema "perfetto" per la dispersione delle uova del parassita nell'ambiente lacustre. Nell'esperienza finlandese, con la canalizzazione della rete fognaria e l'uso di idonei impianti di depurazione si sono ottenuti buoni risultati, pur senza raggiungere mai una completa eradicazione (Schiavo, 1997). Gli impianti di depurazione, infatti, sono in grado di trattenere tra il 95% ed il 99% delle uova e possono subire malfunzionamenti sufficienti alla eliminazione delle uova in acqua (Von Bonsdorff e Bylund, 1982). Inoltre, alcune deiezioni umane vengono immesse direttamente in acqua dai diportisti e dai pescatori, sia professionisti sia sportivi, contribuendo al mantenimento del ciclo;

- consumo di pesce lacustre poco cotto o crudo che l'introduzione di pratiche culinarie esotiche ha favorito notevolmente in questi ultimi anni e che rappresenta il fattore di maggiore criticità. Si pensi infatti alle preparazioni orientali come il *sushi* ed il *sashimi* estremamente di moda nella ristorazione italiana ed europea, ma anche al carpaccio di persico e lavarello in Italia, al carpaccio *d'omble chevalier* e al *poissons du lac façon nordique* in Francia.

Recentemente in Francia ed in Svizzera, paesi in cui alla pari del nostro la difillobotriasi è da considerarsi endemica nell'areale alpino, si sono registrati casi umani sostenuti da *D. nihonkaiense*, specie di comune riscontro in Giappone (Yera *et al.*, 2006; Wicht *et al.*, 2007). I casi riportati riferivano consumo di salmoni crudi (*Oncorhynchus keta*) importati da Canada o Nord America.

Queste segnalazioni vanno comunque ricondotte alla importazione di prodotti ittici provenienti da paesi altamente endemici ed in grado di causare casi sporadici o piccoli episodi epidemici a seguito del consumo di questi prodotti crudi o poco cotti da parte di singoli o di comunità (Borroni e Grimaldi,

1973; Williams e Jones, 1994; Woo, 1996; Bonini *et al.*, 1998; Peduzzi e Boucher-Rodoni, 2001; Dupuoy- Camet e Peduzzi, 2004).

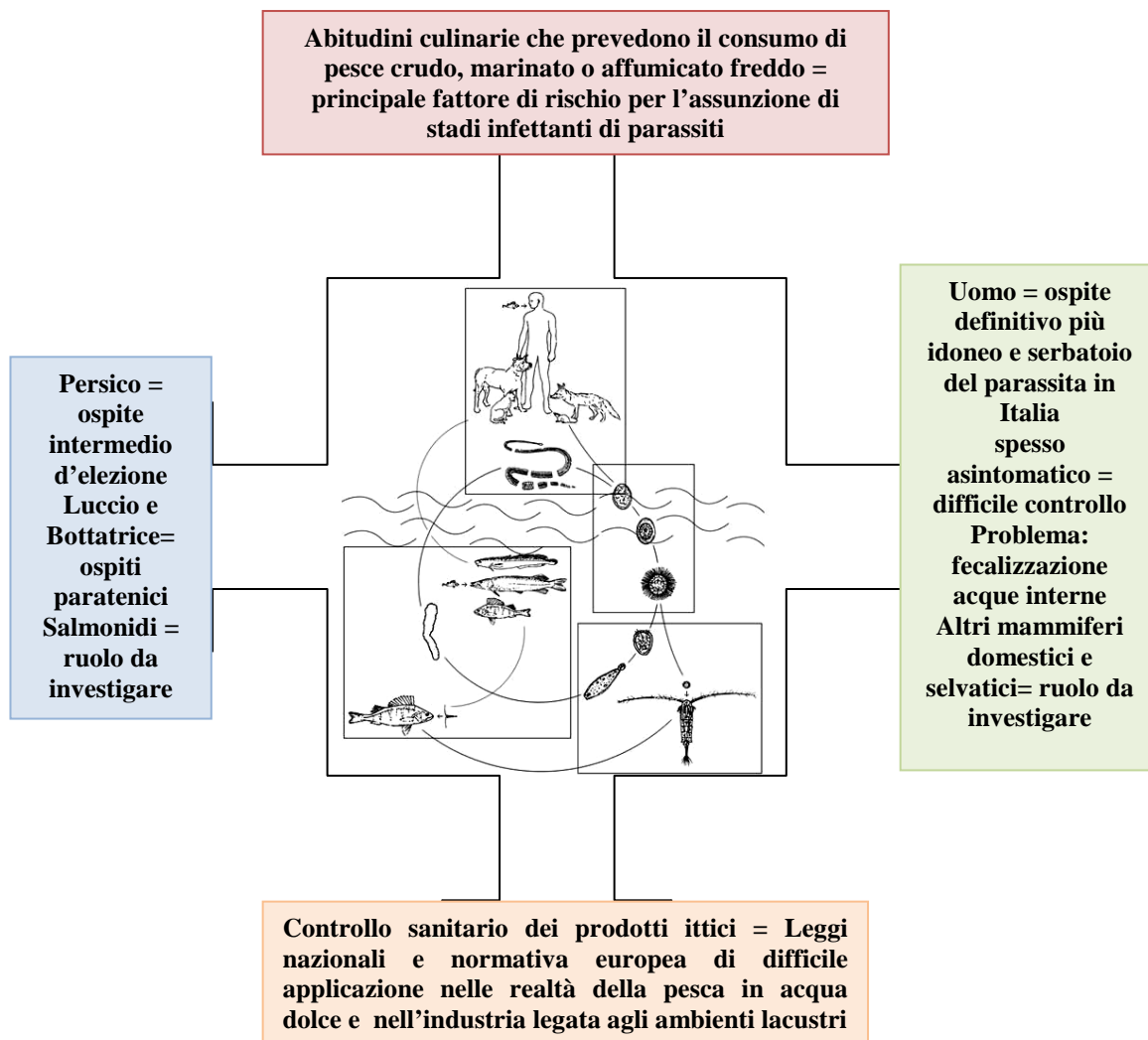
Esistono situazioni di endemia anche in numerosi paesi extraeuropei, in Asia (Siberia), Africa (Uganda), America del Nord (aree canadesi dei grandi laghi) e America Latina con fenomeni di recrudescenza della parassitosi in diversi paesi (Santos e de Faro, 2005). A tal proposito la crescente movimentazione di prodotti ittici, sia derivanti dalla pesca che dalle attività di acquacoltura, e la crescente diffusione di abitudini alimentari a rischio, rappresentano senz'altro fattori di rischio per la trasmissione di questi parassiti zoonosici con fenomeni di recrudescenza o di segnalazione di specie esotiche.

In relazione all'epidemiologia della Difillobotriasi, va posto in evidenza come diverse specie di mammiferi ittiofagi possano essere coinvolte nel ciclo biologico di *D. latum*, sebbene l'uomo ne rappresenti l'ideale ospite definitivo con maggior percentuale di schiusa delle uova prodotte (79%) rispetto ad altri mammiferi non umani (ad esempio < 1% nel cane) (Essex e Magath, 1931).

Inoltre bisogna tener conto della maggior longevità, più di un decennio nell'uomo, pochi mesi nel cane e nel gatto (Morishita *et al.*, 1973) e delle maggiori dimensioni del parassita nell'uomo.

Tuttavia permane il dubbio che esistano tra gli animali piscivori domestici e selvatici una o più specie che possano fungere da serbatoio naturale del parassita anche in assenza dell'uomo. Questo permetterebbe il mantenimento del ciclo biologico indefinitamente, a causa del più difficile controllo. Resta quindi aperto un importante quesito che solamente con un'indagine epidemiologica ad ampio raggio sulla fauna locale potrà nel futuro venire chiarito.

Nello schema seguente vengono riassunti i principali interventi preventivi e fattori di rischio connessi al ciclo biologico di *D. latum* in Italia.



Dal punto di vista sintomatologico, la difillobotriasi è caratterizzata principalmente da un andamento paucisintomatico o, il più delle volte, dalla totale assenza di sintomi, con notevoli complicazioni di carattere diagnostico e conseguenti limitazioni nella conduzione di studi epidemiologici. Per tali motivi si pensa che la diffusione della Difillobotriasi umana in Italia sia attualmente sottostimata.

Qualora sia presente un quadro clinico, questo generalmente si manifesta con astenia, vertigine, dolori addominali, dolore epigastrico, diarrea a volte alternata a stitichezza, vomito, perdita di peso fino ad una carenza di vitamina B₁₂ con anemia megaloblastica causata da un assorbimento selettivo del parassita (Nyberg, 1963). Quest'ultima evenienza è da considerarsi estremamente rara (Von Bonsdorff, 1948; Wicht *et al.*, 2007) ed associata ad un'infestazione cronica in soggetti adulti.

Per quel che concerne la terapia, praziquantel e niclosamide sembrano essere i farmaci maggiormente efficaci nel devitalizzare gli adulti del parassita (Perera *et al.*, 1970; Bylund *et al.*, 1977; Kirkpatrick *et al.*, 1987).

Negli ultimi anni sono comunque in corso studi per trovare nuove molecole efficaci e a basso costo. Inoltre si sta rivolgendo l'attenzione verso prodotti naturali come l'estratto da *Flemingia vestita*, una pianta medicinale indigena dell'India nord-orientale, che viene considerata dagli indigeni un antielmintico naturale, attivo in particolare contro trematodi e cestodi. Sono stati infatti effettuati studi *in vitro* nei confronti di *Raillietina echinobotrida* (Cestoda: Davaineidae), parassita aviare, che sembrano dimostrare come i diversi componenti dell'estratto crudo della pianta siano in grado di determinare un'alterazione dell'attività acetilcolinesterasica del parassita, inducendo lesioni nel tegumento (Das *et al.*, 2004).

Per condurre campagne volte alla eradicazione della parassitosi bisogna quindi tener conto di alcuni fattori fondamentali, quali la frequente asintomaticità dei portatori e l'elevato rischio di introduzione di diverse specie di Diphylobothriidae attraverso flussi di immigrazione o turismo (i laghi sub-alpini sono aree ad alta vocazione turistica) provenienti da aree endemiche, data anche l'estrema fecondità del parassita.

Per quanto riguarda la prevenzione dell'infestazione dell'uomo, la sensibilizzazione delle categorie a rischio e l'educazione sanitaria e alimentare sono strategie da cui non si deve prescindere se si vogliono ottenere risultati almeno discreti.

Sono da evitare inoltre tutte quelle pratiche che portano al consumo di pesce crudo, poco cotto, marinato od affumicato a freddo.

Tra i metodi di controllo individuale, che verranno trattati in modo completo successivamente (capitolo 6), ricordiamo che la larva plerocercioide è devitalizzata a 56° C per cinque minuti, temperatura normalmente raggiunta nella cottura del pesce, e che il congelamento è estremamente efficace, infatti a -10°C si ha la devitalizzazione delle larve in 8-72 ore a seconda dello spessore del filetto (Morishita *et al.*, 1973; Peduzzi e Boucher-Rodoni, 2001).

Prendendo in considerazione l'intero ciclo biologico del parassita, che coinvolge almeno tre ospiti (un mammifero ittiofago come ospite definitivo, un invertebrato planctonico come primo ospite intermedio e una o più specie ittiche come secondo ospite intermedio idoneo o paratenico), molto difficile, se non impossibile, sarebbe andare ad agire sui primi ospiti intermedi, essendo questi allo stato libero all'interno di bacini idrici di dimensioni ragguardevoli.

Per quanto riguarda il primo ospite intermedio, solitamente ascrivibile a più specie di crostacei copepodi dei generi *Eudiaptomus*, *Cyclops* e *Diaptomus*, il rilevamento degli stadi procercoidi è di notevole difficoltà per le positività generalmente basse riscontrabili in tali crostacei (Dörücü, 1999), confermata anche da indagini recenti in cui non si sono rilevate positività per *D. latum* in migliaia di copepodi esaminati (Wicht *et al.*, 2007a). Contrastano con questi dati i risultati pubblicati da Guttowa (1963) che riporta alte prevalenze di procercoidi di *D. latum* in *Cyclops strenuus* (con picchi del 52% nel mese di giugno) e *Thermocyclops* sp. (dal 18 al 23% durante tutto l'anno) ma la cui identificazione morfologica non è dimostrata in modo efficace. Inoltre le difficoltà d'identificazione dei procercoidi a livello morfologico rendono indispensabile la messa a punto di metodiche molecolari; permane comunque qualche dubbio sull'utilità di tale approccio, data la bassa specie-specificità nei confronti del primo ospite intermedio e l'impossibilità di praticare un controllo efficace su organismi alla base della catena alimentare in un ambiente delle dimensioni di un sistema lacustre.

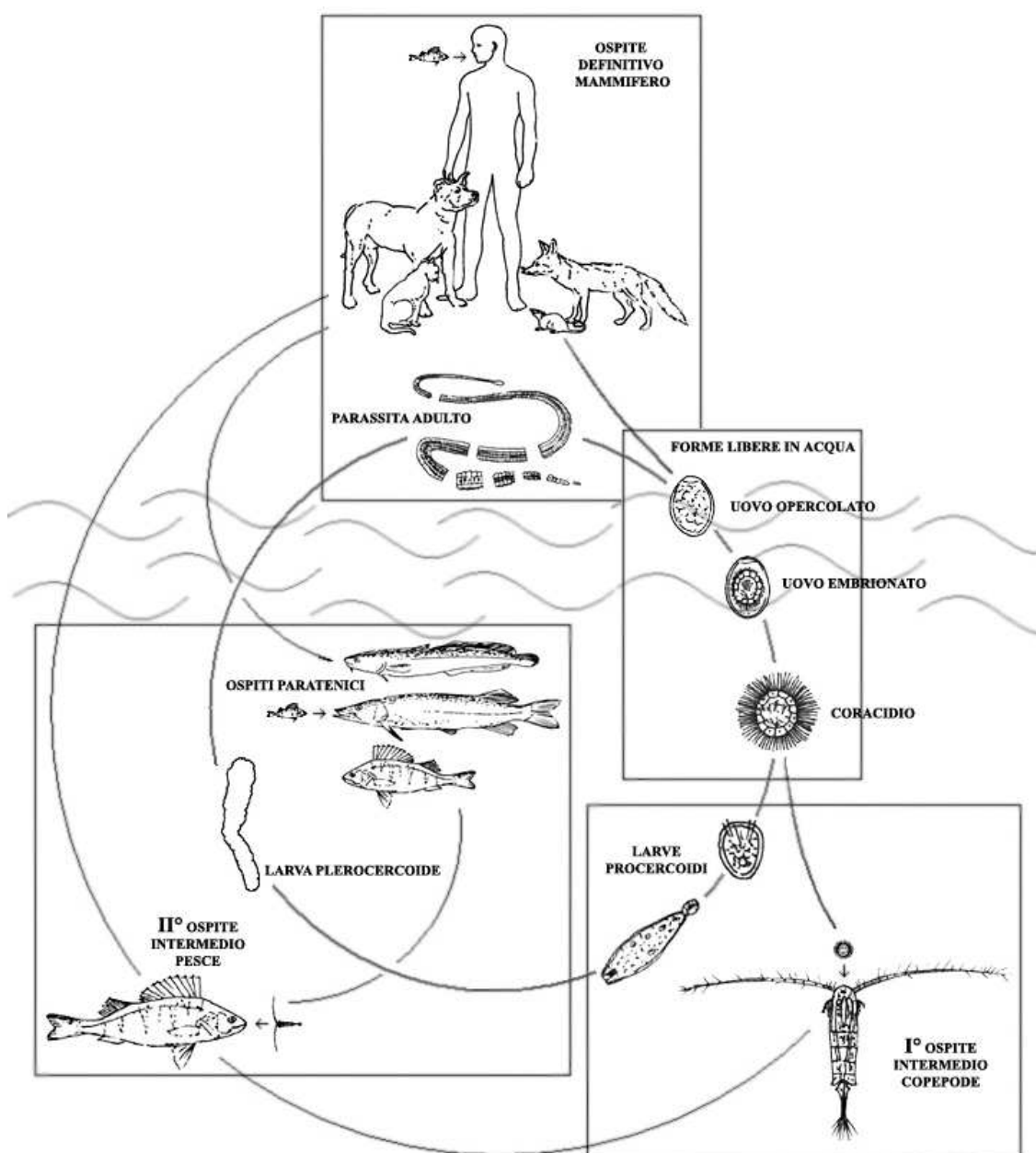


Fig. 10 - Ciclo biologico di *D. latum*

3. PLEROCERCOSI DA CESTODI TRIAENOPHORIDAE

3.1. PREMESSA

Nel corso del 2005 la segnalazione in Alto-Adige di un'infestazione muscolare di natura parassitaria nella popolazione di coregoni (*Coregonus* spp.) presente in alcuni laghi, aveva portato ad effettuare un'indagine parassitologica volta all'individuazione dell'agente eziologico, con il sospetto che potesse essere causata dal parassita zoonosico *Diphyllbothrium latum*.

Successivamente nel 2006 la ricerca è stata ampliata ad un maggior numero di laghi della provincia su richiesta del Servizio Veterinario Provinciale e dell'Ufficio Caccia e Pesca della Provincia di Bolzano per monitorare la diffusione della parassitosi sul territorio.

La presenza di questa specie parassitaria particolarmente invasiva per l'ospite pesce e fino al 2005 mai segnalata sul territorio italiano, di nessuna rilevanza zoonotica ma da tenere in considerazione per la diagnosi differenziale con plerocercosi ittiche zoonotiche (vedi Difillobotriasi), ha spinto ad investigare le dinamiche che hanno portato all'introduzione di *Triaenophorus crassus* sul nostro territorio, iniziando da un'approfondita indagine epidemiologica volta ad appurare se il ciclo biologico del parassita fosse completo nell'ambiente in studio.

3.2. MATERIALI E METODI

3.2.1. CAMPIONAMENTO

Sono stati presi in considerazione 10 laghi della provincia di Bolzano e 3 canali (fosse).

Sistemi idrici monitorati

- 1 S. Valentino alla Muta
- 2 Grande Monticolo
- 3 Piccolo Monticolo
- 4 Costalovara
- 5 Favogna
- 6 Fié
- 7 Castero
- 8 Caldaro
- 9 Varna
- 10 Herzweiher
- A Fossa di Salurno
- B Fossa grande di Caldaro
- C Fossa piccola di Caldaro



I pesci sono stati campionati in parte mediante elettrostorditore e in parte con reti volanti con l'ausilio delle guardie provinciali. Con il coinvolgimento dei gestori del Lago di San Valentino è stato possibile inoltre ottenere dai pescatori sportivi afferenti al lago stesso alcuni pacchetti viscerali di luccio (*Esox lucius*), preda molto pregiata e quindi difficilmente ottenibile *in toto*.

Le specie ittiche esaminate sono indicate nella tabella seguente.

Lago	Specie ittica esaminata	N soggetti esaminati	Periodo
S. Valentino alla Muta	<i>Coregonus</i> sp.	168	Lug 2005 – Nov 2007
	<i>Esox lucius</i>	6	Lug 2005 – Ago 2007
	<i>Salmo trutta fario</i>	4	Ott 2005
	<i>Cottus gobio</i>	2	
	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	1	
	<i>Rutilus erythrophthalmus</i>	1	Mag 2006
Grande Monticolo	<i>P. fluviatilis</i>	2	Ott 2006
	<i>E. lucius</i>	8	Giu 2006, Ott 2006
	<i>L. gibbosus</i>	6	Ott 2006
Piccolo Monticolo	<i>P. fluviatilis</i>	3	Ott 2006
	<i>E. lucius</i>	5	
	<i>L. gibbosus</i>	6	

Costalovara	<i>P. fluviatilis</i>	5	Lug 2006
	<i>E. lucius</i>	4	
Favogna	<i>P. fluviatilis</i>	6	Lug 2006
	<i>E. lucius</i>	3	
Fié	<i>P. fluviatilis</i>	5	Ott 2006
	<i>E. lucius</i>	3	
Castero	<i>E. lucius</i>	2	Lug 2006
Caldaro	<i>P. fluviatilis</i>	7	Lug 2006
	<i>E. lucius</i>	12	
	<i>L. gibbosus</i>	6	
	<i>S. luciopercae</i>	3	
Varna	<i>P. fluviatilis</i>	5	Ott 2006
	<i>E. lucius</i>	5	
Herzweiher	<i>Coregonus</i> sp.	2	Dic 2006
Fossa di Salurno	<i>E. lucius</i>	1	Giu 2006
Fossa grande di Caldaro	<i>P. fluviatilis</i>	4	Lug 2006
	<i>E. lucius</i>	4	
	<i>L. gibbosus</i>	4	
	<i>S. luciopercae</i>	1	
Fossa piccola di Caldaro	<i>E. lucius</i>	1	Lug 2006
Totale		295	

Tab. 6 - Specie ittiche esaminate per la ricerca di larve plerocercoidi di cestodi Triaenophoridae, suddivise in base al sito e al periodo di campionamento.

I pesci sono stati trasportati in laboratorio a temperatura di refrigerazione; successivamente venivano pesati, misurati e sottoposti ad esame parassitologico secondo la SOP MIPAV ITT 10.01.02 (vedi Allegato I) annotando gli eventuali reperti parassitari in una scheda appositamente preparata per questa ricerca (Vedi Allegato III).

I valori di prevalenza, intensità d'infestazione ed abbondanza sono stati intesi nel senso di Bush *et al.* (1997).

I parassiti rinvenuti sono stati isolati dal tessuto, risciacquati in soluzione fisiologica per qualche ora e successivamente fissati in alcool 70° per consentirne l'identificazione su base morfometrica e molecolare. Alcune porzioni di organo parassitate sono state inoltre fissate in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione dell'esame istologico.

Alcuni esemplari sono stati successivamente processati per la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) attraverso progressiva disidratazione in etanolo

(80°-90°-100°) ed esametildisalazano, metallizzazione in oro ed osservazione mediante microscopio a scansione Jeol 5100.

L'identificazione dei parassiti è stata effettuata utilizzando chiavi tassonomiche specifiche (Kuperman, 1973; Hoffman, 1999) attraverso l'analisi morfometrica al microscopio ottico degli uncini presenti nello scolice, mediante camera lucida ed analisi d'immagine con software (QuickPHOTO MICRO 2.1), quest'ultima eseguita durante il periodo di formazione/ricerca presso l'Istituto di Parassitologia dell'Accademia delle Scienze di Ceske Budejovice (Repubblica Ceca).

Sono stati presi in considerazione i 4 parametri utilizzati da Kuperman (1968; 1973): Larghezza Base (LB), Altezza Base (AB), Lunghezza Dente Maggiore (LDM), Lunghezza Dente minore (LDm), a cui sono stati aggiunti nell'analisi d'immagine mediante software 3 ulteriori parametri, consistenti nelle reciproche distanze tra le cuspidi dell'uncino (fig. 8)

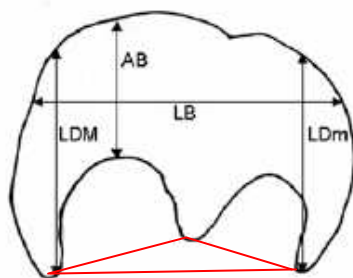


Fig. 11 - Parametri utilizzati per la misurazione degli uncini di *Triaenophorus crassus* secondo Kuperman (1973): LB=Larghezza Base; AB=Altezza Base; LDM=Lunghezza Dente Maggiore; LDm= Lunghezza Dente minore; in rosso i 3 parametri aggiuntivi presi in considerazione mediante analisi d'immagine

L'identificazione è stata inoltre confermata su base molecolare utilizzando lo stesso protocollo adottato per l'identificazione dei plerocercoidi reperiti nei pesci del Lago di Como, cui si rimanda nel capitolo precedente.

Parallelamente al campionamento delle specie ittiche, nel periodo 2005-2007 sono stati condotti 8 campionamenti di crostacei copepodi, segnalati in letteratura come primi ospiti intermedi del parassita in esame (Kuperman, 1973). In dettaglio nel 2005 sono stati campionati 328 copepodi nel mese di ottobre, nel 2006 sono stati esaminati 2800 copepodi (1650 nel mese di maggio e 1150 a luglio) mentre nel 2007 sono stati 2692 (505 copepodi a maggio, 848 a giugno, 352 a luglio, 763 a settembre e 224 a novembre). La raccolta dei

copepodi è stata condotta mediante retino da zooplancton in prossimità della riva e in mezzo al lago di San Valentino.

Il materiale raccolto veniva posto in contenitori con acqua di lago mantenuta alla temperatura d'origine fino all'arrivo in laboratorio. Una volta in laboratorio i campioni venivano posti in acquari da 5 litri ossigenati con pietra porosa; si procedeva quindi ad isolare i crostacei copepodi mediante setacci da 200 μm e a sottoporli ad esame parassitologico per la ricerca di stadi larvali di cestodi (larve procercoidi) mediante osservazione microscopica a piccolo ingrandimento.

3.2.2. PROVE DI INFESTAZIONE SPERIMENTALE DI CROSTACEI COPEPODI

In seguito al reperimento di un parassita adulto vitale nell'intestino di uno dei lucci campionati, si è provveduto a raccogliere una grande quantità di uova trasferendole immediatamente in piastre per colture cellulari a 6 pozzetti (100 uova/pozzetto) contenenti acqua dechlorinata. Le piastre venivano mantenute a temperature di 18 e 25°C ± 1 e venivano sottoposte ad osservazione allo stereomicroscopio ogni 24 ore.

Una volta ottenuta la schiusa dei coracidi, alcuni crostacei copepodi precedentemente stabulati venivano trasferiti dall'acquario alle piastre per colture cellulari in numero di 16/pozzetto dopo aver verificato l'assenza di parassiti visibili allo stereomicroscopio.

I copepodi venivano quindi osservati quotidianamente per rilevare il tasso di mortalità e l'eventuale presenza di parassiti, procedendo a sacrificarne 2/pozzetto ogni 48 ore sottoponendoli ad osservazione microscopica a fresco.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel Lago di San Valentino durante il periodo 2005-2007 sono stati esaminati complessivamente 170 coregoni, provenienti da 2 laghi (San Valentino e Herzweiher), di cui 147 (88,8%) sono risultati positivi a livello muscolare per la presenza di larve plerocercoidi di cestodi identificabili come Triaenophoridae (Cestoda: Bothriocephalidea) grazie alla morfologia dello scolice ed alla presenza dei caratteristici uncini (Bray *et al.*, 1994; Hoffman, 1999). A livello differenziale con *Diphyllbothrium* spp. l'aspetto delle cisti nel muscolo è piuttosto simile e può trarre in inganno, ma l'isolamento dei parassiti permette di differenziare le due specie in quanto i plerocercoidi di *Diphyllbothrium* spp. sono liberi tra le fibre muscolari mentre gli altri sono racchiusi in una cisti e fuoriescono quando questa viene forata e spremuta (fig. 8) estendendosi per una lunghezza che può raggiungere i 20 cm.

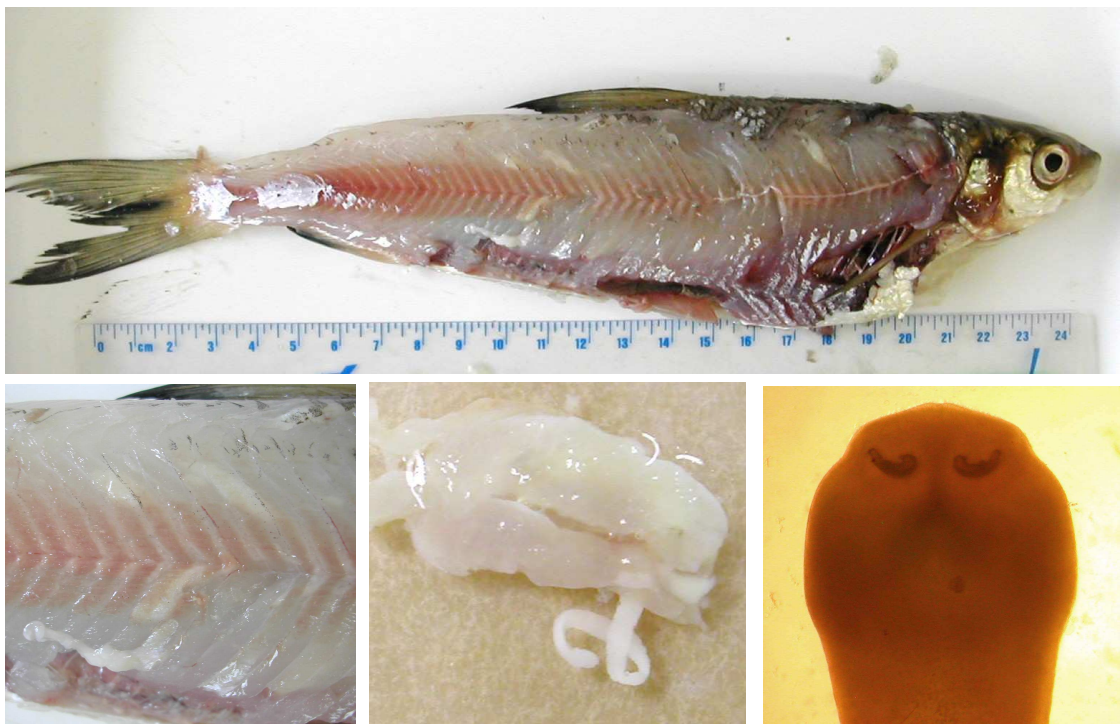


Fig. 12 - Plerocercosi muscolare in coregone del lago di san Valentino (BZ)

L'esame parassitologico delle altre specie ittiche in esame nel Lago di San Valentino ha permesso di rilevare la presenza di larve plerocercoidi della stessa

specie in 2 (50%) delle 4 trote fario esaminate (intensità d'infestazione: 1) e di sub-adulti ed adulti del parassita nell'intestino di tutti e 6 i soggetti di luccio esaminati (intensità d'infestazione media 65,8; range: 5-300). I soggetti di scardola e scazzone esaminati sono invece risultati negativi (fig. 9-10).

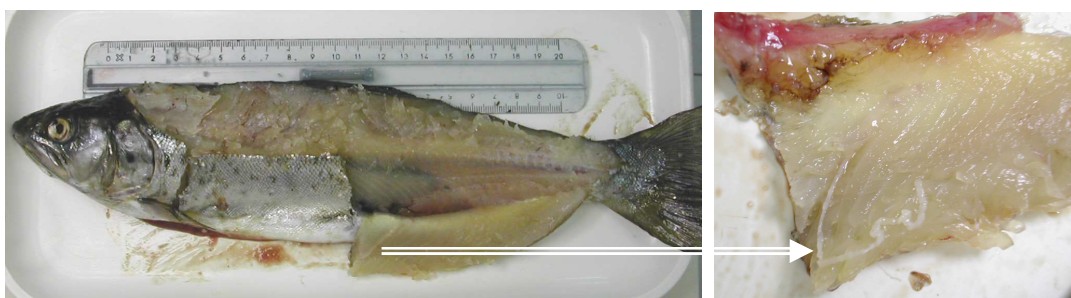


Fig. 13 - Plerocercosi da cestodi Triaenophoridae in trota fario del lago di san Valentino (BZ)



Fig. 14 - Infestazione da cestodi Triaenophoridae adulti in luccio del lago di san Valentino (BZ)

L'osservazione delle principali caratteristiche morfometriche dei parassiti chiarificati in lattofenolo, relative soprattutto alle due coppie di uncini, ha permesso di ascrivere il parassita isolato alla specie *Triaenophorus crassus* (Cestoda, Triaenophoridae), prima segnalazione in Italia di questo parassita.

L'identificazione si è basata principalmente sulle caratteristiche morfometriche dello scolice e delle due coppie di uncini presenti alla sua sommità, caratteri apprezzabili anche mediante SEM.

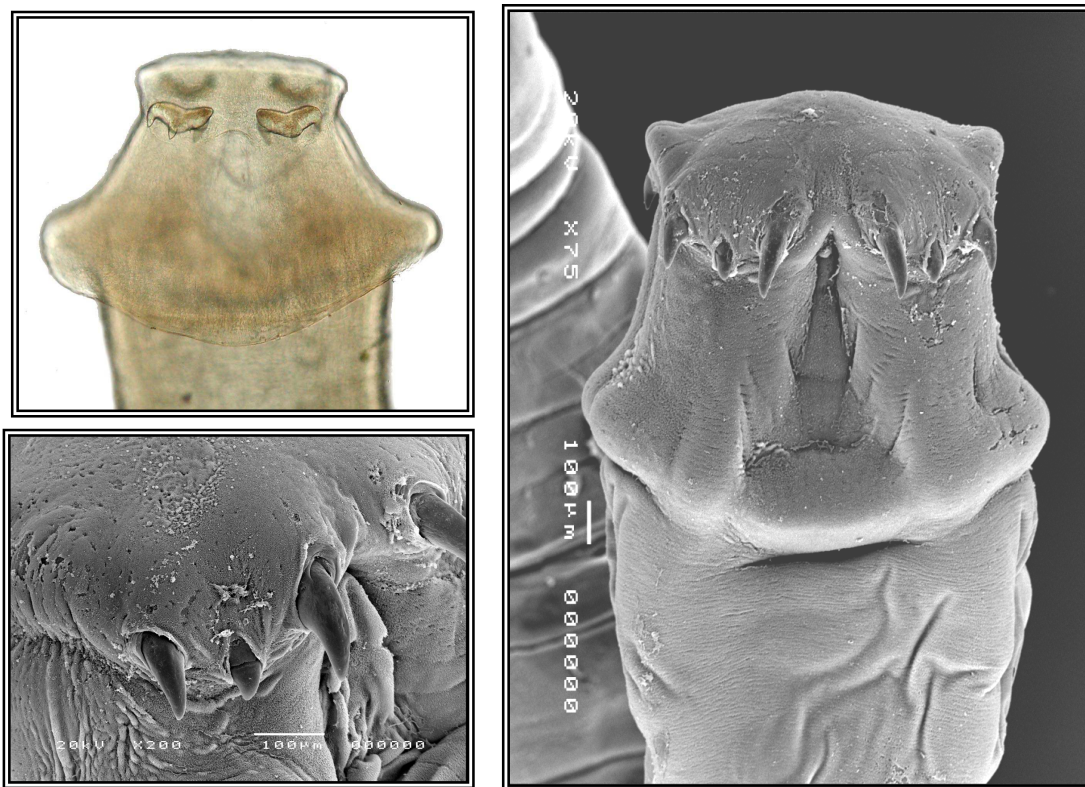


Fig. 15 - Adulto di *T. crassus* isolato da luccio



Fig 16- Pleroceroide di *T. crassus* isolato da coregone

Nella figura e nella tabella seguenti vengono riportate le misure dei 4 parametri utili all'identificazione di *T. crassus* secondo Kuperman (1973), effettuate su 60 uncini (uno per parassita) di 30 larve plerocercoidi mature e 30 esemplari adulti e sub-adulti isolati dall'intestino di uno dei lucci esaminati.

<i>Triaenophorus crassus</i>	N. uncini	LB*	AB*	LDM*	LDm*
Larve plerocercoidi	30	250-303 (278,0±18,355)	120-167 (143,0±8,447)	174-258 (224,4±16,439)	142-193 (168,5±15,355)
Sub-adulti e adulti	30	260-327 (290,2±14,824)	130-168 (146,8±12,349)	205-275 (232,5±24,937)	145-202 (174,2±14,202)
Totale	60	250-327 (284,1±17,642)	120-168 (144,9±10,658)	174-275 (228,5±21,338)	142-202 (171,4±14,949)

*Min-max (media ± Deviazione Standard)

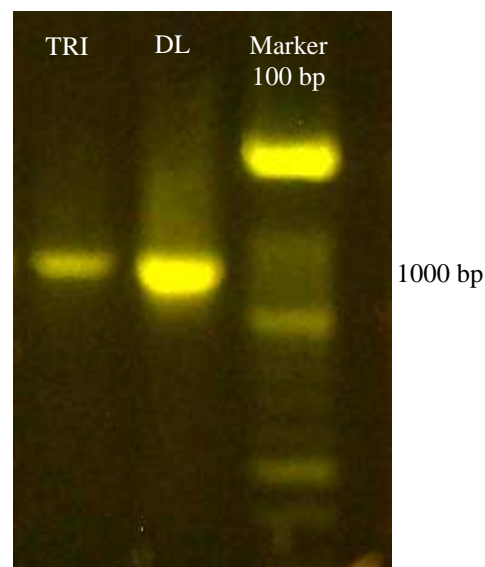
Tab. 7 - Misure degli uncini di *Triaenophorus crassus* (µm).

I valori rilevati sono risultati sovrapponibili a quelli indicati da Kuperman (1973) per *T. crassus*.

L'identificazione è stata successivamente confermata a livello molecolare attraverso l'impiego dell'eminested PCR (primers 82F-81R e 82F-84R). Il campione identificato come *Triaenophorus crassus* ha mostrato una banda di circa 1200 bp (Figura a lato).

La discriminazione è stata possibile solo dopo l'analisi delle sequenze mediante BLAST.

Nelle due figure seguenti vengono riportate rispettivamente la sequenza di *Triaenophorus crassus* (1179 bp) e il risultato di BLAST che conferma l'identificazione con un'identità del 99%.



Elettroforesi dei campioni esaminati.
DL= *Diphylobothrium latum*;
TRI= *Triaenophorus*

1 TGCACGCCCTT CATACGGTGA AACCGCGAAT GGCTCATTAA ATCAGCTATG GTTTATTGGA TCATACCCGT TAAATGGATA ACTGTAATAA CTCTAGAGCT

101 AATACATGCC CCGAAGCCCT GACCCGCGAG GGAATGGGTG CACTTATTAG ATCAGAAGCC AACCAAGGTAG TGTCTCTCTG CTTTCGGGTG GGAGCTCCGC

201 TGCCTGTCGT CCTTCTGGTG ACTCTGGATA ATTGTTACAG ATCGCAGTCG GCCTTGCGTC GCGGACGGGT CCTTCAAAATG TCTGCCCTAT CAACCTTTCGA

301 TGGTAGGTGA CCTGCCTACC ATGGTGATAA CGGGTAACGG GGAATCAGGG TTCGATTCCG GAGAGGGAGC CTGAGAAACG GCTACCACTT CCAAGGGAGG

401 CAGCAGGCGC GCAAAATTACC CACTCCCAGT ACGGGGAGGT GGTGACGAAA AATACCGATG CGGGACTCTT ATTGAGGCTC CGTAATCGGA ATGAGTGAAAC

501 TCTAAATCCT TTCACGAGGA TCAATTGGAG GGCAAGTCTG GTGCCAGCAG CCGCGGTAAC TCCAGCTCCA ATAGCGTATA TTAAGTTGC TGCAGTTAAA

601 AAGCTCGTAG TTGGATCTCG GTATCACTGT CGCCTGCCAG TCG 544 bp G ATTGTGCTG TGTGTGTAGG TGGGACCGTG CTCTGCGCGG CACCCCTCGC

701 CCAGGCGCGG TTATGCTCGA GTTGCGGTGG TGGTGGTCTC ACCTTTCAGC CATGCTCTGTG GTGAAATACC CGCAGGTGTA GCGAGTGTG AGGCGGTGCT

801 CTGCGACAGT AAGGTCCGTC GGCTCGTTTG CATGCCTCTG GATGCCCTTC AAAAGGTGTC TATGGGCGGA TGGCAGCTTT ACTTTGAACA AATTGAGTG

901 CTCAAACCAG GCCGATGTTG CCTGAAAAGT TTGTCATGGA ATAATGGAAT AGGACTTCGG TTCTATTTCG TTGGTTTTCG GATCCGAAAGT AATGATCAAA

1001 AGAGACAGGC GGGGACGTTT GTATGGTTGC GCTAGAGGTG AAATTCATGG ACCGTAACCA GACAACTAA AGCGAAAGCA TTCGTCAGC ATGTTTTCAT

1101 TGGCCATGAG CGAAAGTCAG AGGCTCGAAG ACGATCAGAT ACCGTCCTAG TTCTGACCAT AAACGATGCC AACTGACGAT CCGTGGTGGT AGTATTTTAA

1201 CCATCCCCAC GGGCAGTCCC CGGGAAAACC

Trienophorus crassus

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi115605650 DQ925318.1	<i>Trienophorus crassus</i> 18S ribosomal RNA gene, complete	2172	2172	100%	0.0	99%
gi115605645 DQ925313.1	<i>Marsipometra hastata</i> 18S ribosomal RNA gene, complete	1978	1978	100%	0.0	96%
gi169978591 J228773.2	<i>Abothrium gadi</i> 18S rRNA gene	1956	1956	100%	0.0	96%
gi115605635 DQ925303.1	<i>Amphicotyle heteropleura</i> 18S ribosomal RNA gene, compl	1917	1917	100%	0.0	96%

BLAST results per *Trienophorus crassus*

Il ciclo biologico di *T. crassus*, schematizzato di seguito, si sviluppa completamente in ambiente acquatico, riconoscendo come ospite definitivo il luccio europeo (*Esox lucius*), come primo ospite intermedio un crostaceo copepode e come secondo ospite intermedio una specie ittica planctofaga appartenente al gruppo dei salmonidi, coregonidi compresi.

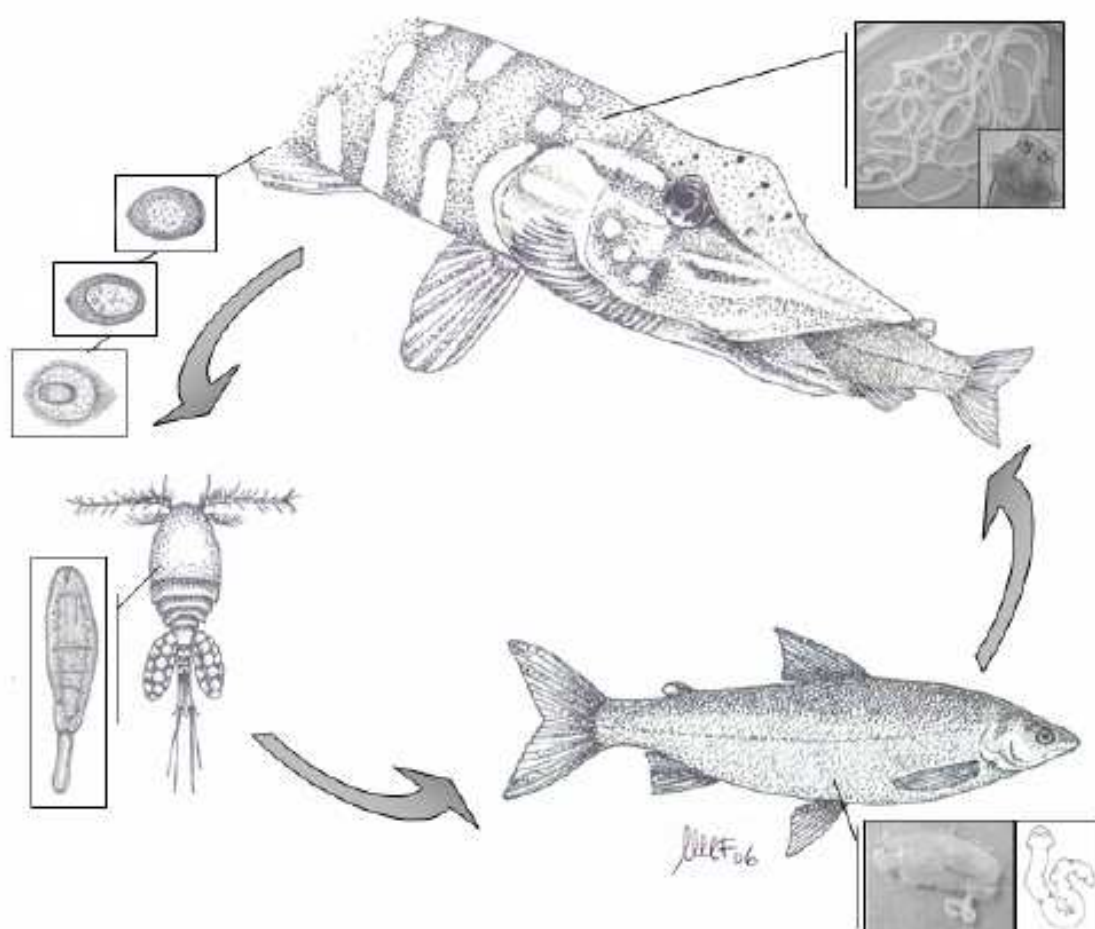


Fig. 17 - Ciclo biologico di *Triaenophorus crassus*

Per quanto concerne l'ospite definitivo i 6 lucci esaminati sono risultati tutti positivi per la presenza del parassita ed hanno mostrato quasi sempre intensità d'infestazione estremamente elevata con picchi di 300 parassiti/soggetto, frequentemente rinvenuti con lo scolice tenacemente infisso nella mucosa. Non è stato possibile condurre esami istopatologici sull'intestino dei lucci parassitati in quanto i campioni erano stati congelati o comunque non erano in condizioni idonee per questo tipo di analisi. Si può comunque ipotizzare, in base alle lesioni macroscopiche lasciate dagli scolici del parassita una volta isolati dalla mucosa intestinale, che *T. crassus* possa essere piuttosto patogeno per il luccio, anche se la sua azione è limitata solo al periodo stagionale in cui l'adulto rimane attaccato alla mucosa intestinale dell'ospite. Infatti, una volta maturo, il parassita si stacca dalla mucosa e, in coincidenza con il periodo di frega, si

libera nell'ambiente acquatico dove eliminerà le uova (Kuperman, 1973). Un esemplare adulto di *T. crassus* può eliminarne fino a un milione al momento della sua espulsione in ambiente acquatico (Kuperman, 1973; Shostak, 1986).

L'uovo lasci schiudere un coracidio, che viene ingerito dal primo ospite intermedio, un crostaceo copepode (numerosi sono le specie recettive), perde immediatamente le cilia e migra nella cavità celomatica dove sviluppa fino allo stadio larvale procercoide.

Tutti i campionamenti condotti nel corso del 2006 (2800 copepodi esaminati) hanno dato esito negativo, mentre nel corso del 2007 i campionamenti sono stati effettuati ad intervalli regolari, permettendo di riscontrare una positività naturale di 10 esemplari su 2692 esaminati (0,4%) nei mesi di giugno e luglio. In 6 soggetti si è inoltre rilevata la presenza di stadi procercoidi di cestodi dell'ordine Proteocephalidea, che vengono considerati di comune riscontro nei nostri ambienti dulciacquicoli.

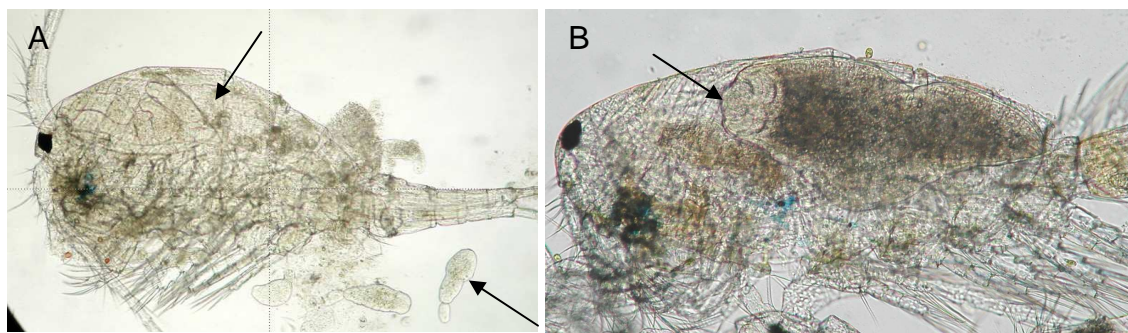


Fig. 18 - Infestazione da procercoidi (freccie) di *T. crassus* (A) e *Proteocephalus* sp. (B) in copepodi

Non si sono riscontrate differenze di positività tra i copepodi campionati in mezzo al lago e quelli prelevati a riva (5 e 5 rispettivamente) sebbene questi ultimi fossero in numero minore (1184 rispetto a 1508), dato che non sorprende visto che i fattori condizionanti sono legati in questo caso alla presenza dei lucci e il lago di San Valentino presenta ambienti idonei alla riproduzione del luccio in quasi tutta la sua estensione.

Se il copepode infestato viene predato da un pesce che rappresenti un secondo ospite intermedio idoneo, la larva procercoide compie una migrazione

dall'intestino alla muscolatura, dove sviluppa a larva plerocercioide, si circonda di una parete cistica e rimane in attesa di essere ingerita dall'ospite definitivo idoneo (Miller, 1952). Secondo alcuni autori il parassita a questo livello sarebbe in grado di resistere oltre 2 anni, in modo indipendente dalla stagionalità, cosa che potrebbe spiegare le elevate prevalenze riscontrate abitualmente nel corso dell'intero anno (Pulkkinen e Valtonen, 1999).

I valori di prevalenza, intensità d'infestazione ed abbondanza dei parassiti da noi osservati nei coregoni sono risultati differenti in base alle diverse classi di taglia, come illustrato nella Tabella 8.

	Classe di Taglia	N° soggetti	N° positivi	Prevalenza (%)	Intensità d'infestazione*	Abbondanza
I	<100g	38	34	89,5	1-35 (5,1)	5,7
II	101-300g	78	72	92,3	1-35 (10,5)	11,3
III	>300g	54	41	75,9	1-29 (5,5)	7,2
Totale		170	147	86,5	1-35 (7,7)	8,9

*Valori min-max (media)

Tab 8 - Valori di prevalenza, intensità d'infestazione ed abbondanza di larve plerocercoidi di cestodi Triaenophoridae in *Coregonus* spp. in relazione alle diverse classi di taglia.

Appare quindi di notevole interesse il riscontro di una prevalenza media della parassitosi molto elevata (86,5%) parimenti a quanto riportato in letteratura (Valtonen *et al.*, 1989; Pulkkinen e Valtonen, 1999) soprattutto in riferimento ad episodi di introduzione del parassita in popolazioni ittiche indenni (Bauer e Solomatova, 1984).

I valori di prevalenza più bassi sono stati osservati nei pesci di taglia maggiore (75,9% vs 89,5% nella classe I e 92,3% nella II), a differenza di quanto riportato da altri autori (Miller, 1945). Tale discrepanza potrebbe essere indice della recente insorgenza dell'infestazione nei coregoni da noi esaminati o derivare dal fatto che i soggetti in studio sono stati suddivisi in base alla taglia e non all'età, come effettuato invece nel passato da altri autori (Pulkkinen e Valtonen, 1999), oppure perché le larve dopo un periodo più o meno lungo vadano incontro a degenerazione. I valori di intensità d'infestazione e di

abbondanza in linea di massima sono abbastanza simili a quelli riportati da altri autori.

I valori minimi e massimi di intensità d'infestazione (1-35) rientrano comunque perfettamente nei range osservati da Miller (1945) in coregoni presenti nei laghi del Nord America. Anche per quanto riguarda l'abbondanza, il valore da noi rilevato (7,2) poco si discosta da quello riportato da Pulkkinen e Valtonen (1999) in coregoni di età inferiore a 7 anni, sebbene nel nostro caso non sia stata definita l'età dei soggetti esaminati. Va comunque puntualizzato che i risultati vanno valutati tenendo in considerazione il fatto che ogni lago presenta condizioni ecologiche peculiari, con variazioni stagionali diverse e con differenti attitudini trofiche nei coregoni presenti (Miller, 1952).

Riguardo gli effetti patogeni del parassita, nei coregoni parassitati non è stata in genere rilevata alcuna lesione macroscopica e lo stato di nutrizione appariva ben conservato, confermando quanto osservato da Pulkkinen e Valtonen (1999), che nelle loro ricerche non apprezzarono differenze di accrescimento tra pesci parassitati e non parassitati nei primi anni di vita, rilevando un aumento della correlazione solo nei soggetti di età > 6 anni. Tuttavia, una netta evidenza che la parassitosi da *T. crassus*, anche ad alte intensità d'infestazione, possa causare un aumento della mortalità nelle popolazioni selvatiche di coregoni non è stata fino ad oggi rilevata (Pulkkinen e Valtonen, 1999), mentre risultano descritti gravi episodi di mortalità riferibili a *T. crassus* in avannotti di *Oncorhynchus mykiss* e *O. kisutch* allevati in gabbia nel canale d'alimentazione di un bacino idroelettrico nell'alto Volga (Bauer e Solomatova, 1984).

L'esame istopatologico condotto su alcuni soggetti massivamente infestati ha comunque messo in evidenza come le cisti contenenti i parassiti siano sempre circondate da numerosi fibroblasti e siano frequentemente associate alla presenza di ampie aree necrotiche, ad emorragie ed infiltrazione di cellule infiammatorie a carico delle fibre muscolari circostanti.

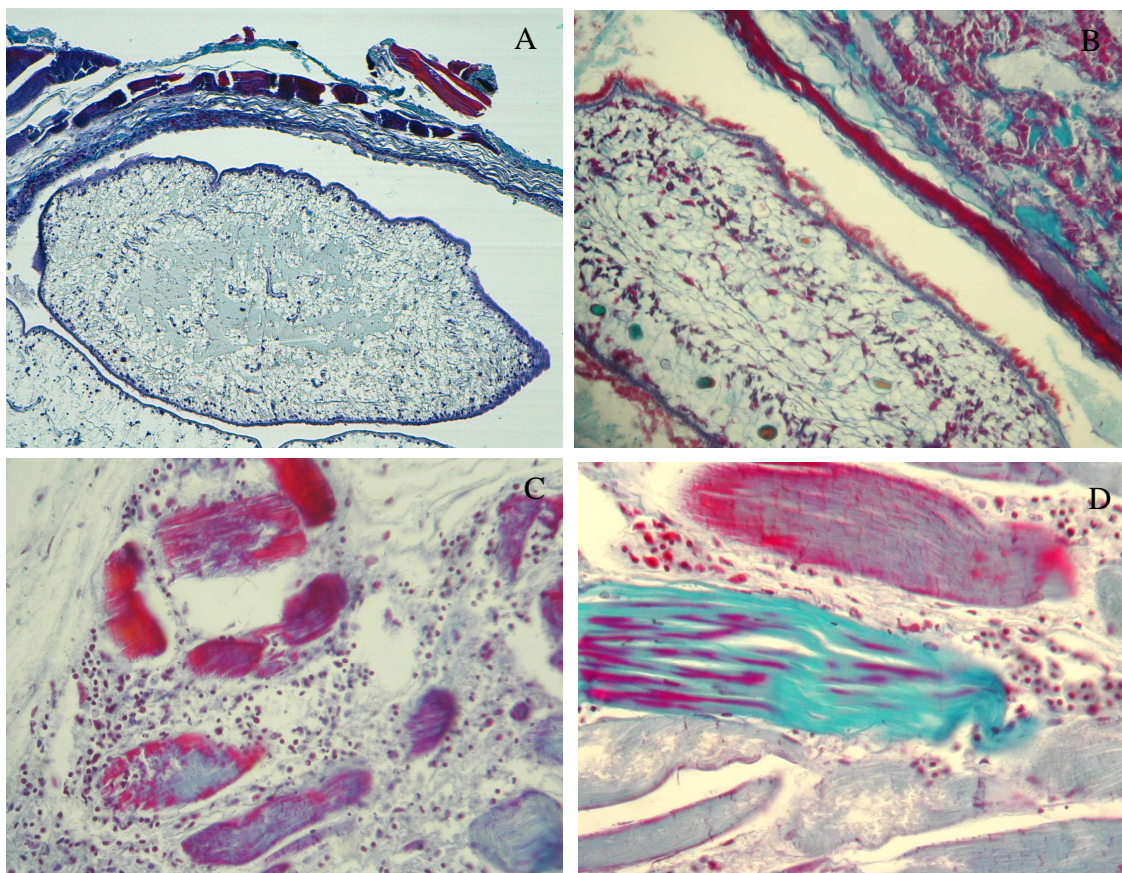


Fig. 19 - Coregone: presenza di grandi cisti circondate da fibroblasti e contenenti larve di *T. crassus* con presenza di vaste aree necrotiche e infiltrazione di cellule infiammatorie (A e B, Tricromica di Masson); presenza di emorragie e necrosi tra le fibre muscolari (C e D, Tricromica di Masson)

Oltre alle conseguenze della localizzazione del parassita a livello muscolare sullo stato sanitario dell'ospite, che spesso presenta disturbi natatori e maggiore suscettibilità alla predazione, le problematiche più rilevanti dell'infestazione muscolare da *T. crassus* derivano senz'altro dal deprezzamento commerciale del prodotto ittico, in quanto le cisti parassitarie lunghe fino a 3 cm, sono facilmente evidenziabili ad occhio nudo nel muscolo laterale, precludendone la commercializzazione e/o consumo pur in assenza di alcun ruolo zoonosico del parassita.

Appare inoltre interessante il reperimento di larve plerocercoidi di *T. crassus* in 2 dei 4 soggetti di trota fario esaminati. Sebbene questa specie ittica sia stata

già annoverata tra i possibili ospiti intermedi del parassita (Kuperman, 1973), nei nostri ambienti dulciacquicoli essa potrebbe rivestire un ruolo epidemiologico importante in quanto molto diffusa e frequentemente utilizzata nei programmi di ripopolamento delle acque libere. In base alle ricerche condotte nel passato, il coregone rimane comunque il salmonide maggiormente idoneo come secondo ospite intermedio, rappresentando quindi il maggiore amplificatore della parassitosi (Miller, 1952).

Per gli ingenti danni che *T. crassus* è in grado di causare in numerose specie di salmonidi selvatici (Miller, 1952) ed allevati (Bauer e Solomatova, 1984), la sua introduzione in Italia rappresenta una seria minaccia, non solo per le popolazioni ittiche presenti nel lago oggetto dell'indagine, ma anche per quelle di numerosi sistemi lacustri limitrofi e dell'intero territorio nazionale.

Dall'analisi dei ripopolamenti effettuati in passato nel lago si ritiene che la presenza di *T. crassus* sia da ricondurre all'introduzione di partite di lucci parassitati provenienti dalla Germania, come peraltro ipotizzato anche nel caso della recente introduzione del parassita in alcuni laghi dell'Austria (Konecny, comunicazioni personali). Questo evento riporta in luce la complessa problematica del controllo delle partite di specie ittiche destinate al ripopolamento, sottoposte di routine al controllo virologico, ma che dal punto di vista batteriologico e parassitologico vengono poco o per nulla considerate.

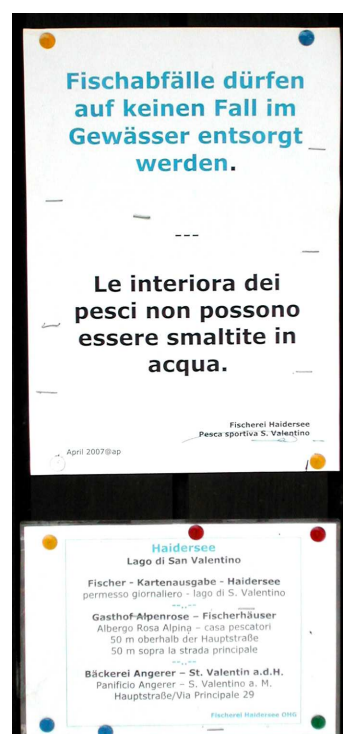
L'impatto economico che la triaenoforosi da *T. crassus* potrebbe avere nel settore dell'industria ittica va posto in relazione soprattutto al deprezzamento commerciale dei coregoni parassitati. Per comprendere la portata del problema basti pensare che alcuni grandi laghi dell'Italia settentrionale fanno dei coregoni un punto di forza dell'economia lacustre locale e che in altri casi questa specie ittica rappresenta una componente rilevante dei ripopolamenti effettuati a scopo di pesca sportiva.

Da diversi decenni il controllo delle infestazioni da *T. crassus* nei coregoni rappresenta una priorità in paesi come Canada e Stati Uniti settentrionali, dove la produzione di *Coregonus artedii* (cisco o tullibee), *C. lavaretus* e *C. clupeaformis* (whitefish) in bacini naturali riveste notevole importanza

commerciale ed ha raggiunto una scala di tipo industriale. Numerose sono state le prove effettuate per tentare di ridurre prevalenza ed intensità d'infestazione del parassita nei coregoni, tutte indirizzate all'interruzione del ciclo biologico di *T. crassus* in una delle fasi di sviluppo. Dopo aver sperimentato l'inefficacia o l'inattuabilità di procedure volte al trattamento di uova e coracidi mediante acidificazione o elettrificazione delle zone di frega del luccio durante il periodo a rischio, o alla riduzione della popolazione di copepodi utilizzando prodotti chimici (Miller, 1952), il maggiore interesse si è orientato verso interventi da condurre sul secondo ospite intermedio e sull'ospite definitivo. La riduzione della presenza dei coregoni (ed in particolare di *C. artedii*, che negli Stati Uniti settentrionali rappresenta la specie più recettiva a *T. crassus*) attraverso la pesca sportiva non regolamentata si è dimostrata estremamente efficace nella realtà nordamericana (Miller, 1952; Dick *et al.*, 2006), anche se nella realtà da noi presa in considerazione risulta essere di difficile applicazione per il forte interesse rivestito dai coregoni.

Per quanto riguarda i lucci, in alcuni laghi americani si è provato ad eliminarli attraverso la pesca intensiva ed utilizzando il rotenone durante il periodo riproduttivo, quando i pesci si concentrano in zone circoscritte (Miller, 1952; Lawler, 1970); tali interventi hanno però mostrato scarsi risultati a lungo termine soprattutto per gli alti costi correlati all'eliminazione dei lucci (Miller, 1952).

Nel nostro caso, a partire dal 2006 una delibera dell'Ufficio Caccia e Pesca della Provincia autonoma di Bolzano, prendendo in considerazione anche i suggerimenti delle Autorità Sanitarie di competenza territoriale, ha esteso la pesca del luccio anche a taglie normalmente non consentite ed ha vietato la reimmissione dei soggetti pescati e/o degli scarti derivanti dalle operazioni di eviscerazione.



Sono state inoltre attuate tutte le precauzioni atte a prevenire lo spostamento di pesci infetti in altre zone, operando un'informazione capillare relativa ai provvedimenti presi nei confronti di tutto il personale operante *in loco*.

Nonostante questi accorgimenti due coregoni del Lago di San Valentino, di cui uno è risultato poi infestato da *T. crassus*, sono stati immessi senza autorizzazione in un altro lago (Herzweiher) da parte di un pescatore sportivo, a dimostrazione di quanto sia semplice provocare ingenti danni per scarsa conoscenza o incuria. Fortunatamente i due esemplari sono deceduti al momento dell'introduzione e subito portati in laboratorio per le analisi parassitologiche.

Nella tabella seguente vengono indicate le specie ittiche esaminate complessivamente escludendo il Lago di San Valentino e il Lago di Herzweiher.

Specie ittica	Nome comune	N soggetti esaminati	N soggetti positivi (%)	Specie parassitaria
Persico	<i>P. fluviatilis</i>	37	11 (29,7%)	<i>T. nodulosus</i>
Luccio	<i>E. lucius</i>	48	5 (10,4%)	<i>T. nodulosus</i>
Persico sole	<i>L. gibbosus</i>	22	0	
Luccioperca	<i>S. luciopercae</i>	4	0	
Totale		111	16 (14,4)	

Tab. 9 – specie ittiche esaminate e positive per *T. nodulosus*

Dai risultati ottenuti, seppur basati su quantitativi piuttosto esigui di pesci, si può dedurre che *T. crassus* risulti al momento presente solo nel lago di San Valentino, probabilmente in relazione alla presenza del coregone limitata in Alto-Adige unicamente a questo ambiente lacustre.

Per quanto riguarda invece il ritrovamento di *Triaenophorus nodulosus*, specie storicamente conosciuta in Italia (Aisa, 1970; Scholz, 1992) che presenta il luccio come ospite definitivo e il persico (più molte altre specie ittiche) come secondo ospite intermedio, stadi larvali plerocercoidi e parassiti adulti sono stati trovati contemporaneamente solo nel Lago di Monticolo

Grande. In questi ambienti si può quindi ragionevolmente affermare che il parassita presenti probabilmente un ciclo biologico naturale completo.

Dal punto di vista patogenetico le osservazioni anatomo-patologiche e istologiche effettuate sugli organi infestati dai plerocercoidi di *T. nodulosus*, soprattutto il fegato nel pesce persico, hanno rilevato un maggiore potere patogeno da parte di questa seconda specie, in quanto nelle sezioni esaminate si sono riscontrati estesi fenomeni di fibrosi e necrosi epatica associate ad emorragie.

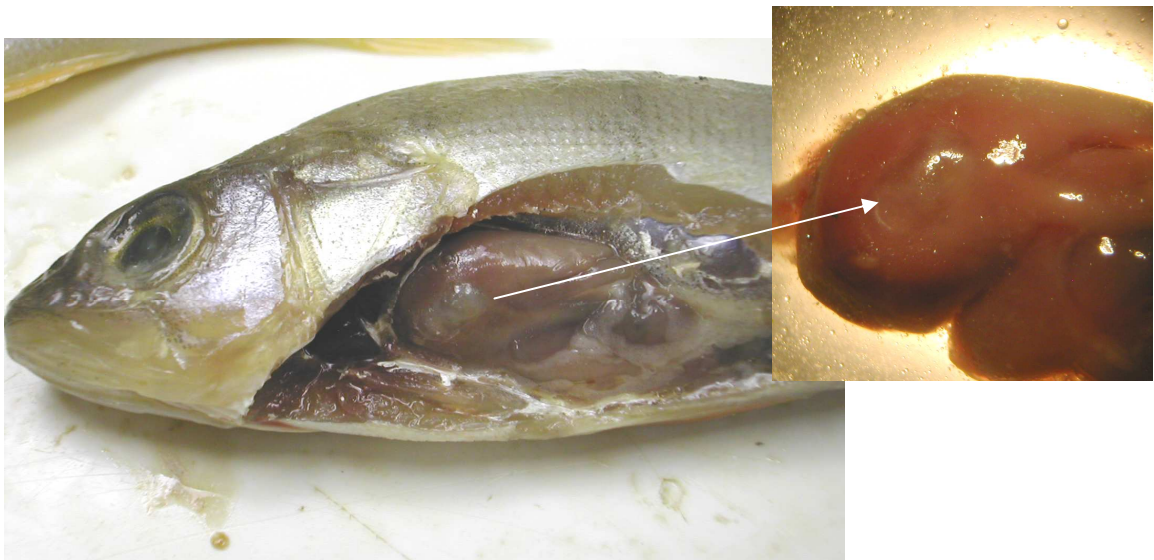


Fig. 20 - Lesioni da *T. nodulosus* a livello epatico in *P. fluviatilis*

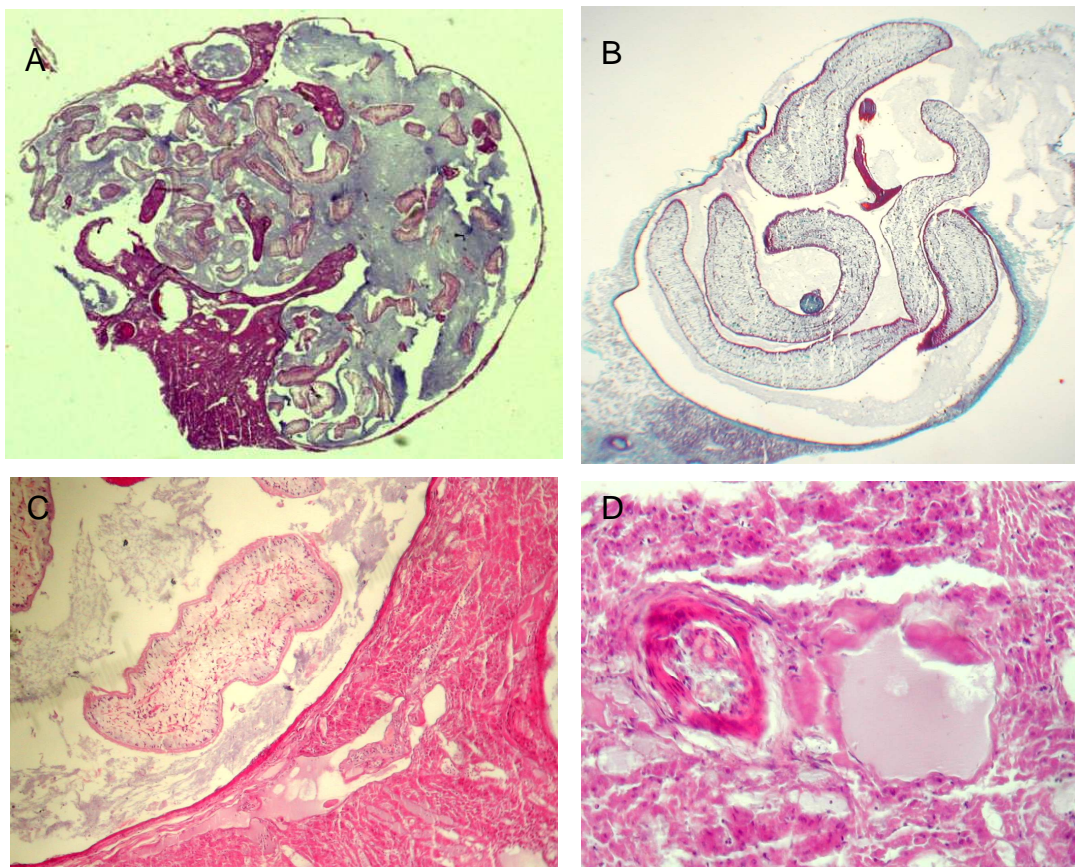


Fig. 21 - Lesioni istopatologiche da *T. nodulosus* a livello epatico in *P. fluviatilis*:
 A) organo *in toto*, EE; B) cisti parassitaria, Tricromica di Masson; C) emorragia intorno ad una
 sezione del parassita, EE; D) aree di flogosi e necrosi epatica, EE

Le due specie reperite nei sistemi lacustri altoatesini secondo la review di Kuperman (1973) farebbero da capofila a due gruppi di tre specie ciascuno appartenenti al genere *Triaenophorus* in ambito europeo, distinti in base ai caratteri morfometrici degli uncini (fig. 21).

In base alle osservazioni condotte nel corso della ricerca la diagnosi differenziale in base alle misure degli uncini all'interno dei due gruppi si presentava particolarmente problematica in quanto le differenze risultavano di minima entità e spesso si assisteva a sovrapposizione di tali misure.

Questi dubbi hanno trovato poi conferma durante il periodo di formazione/ricerca in Repubblica Ceca, in cui l'utilizzo di un software di misurazione dei caratteri morfometrici degli uncini e le successive analisi dei

risultati ottenuti, hanno permesso di operare una revisione tassonomica dell'intero genere *Triaenophorus* (Kuchta *et al.*, 2007) riducendo il numero delle specie valide in ambito europeo da sei a due: *Triaenophorus crassus* e *T. nodulosus*, semplificando in questo modo l'approccio diagnostico.

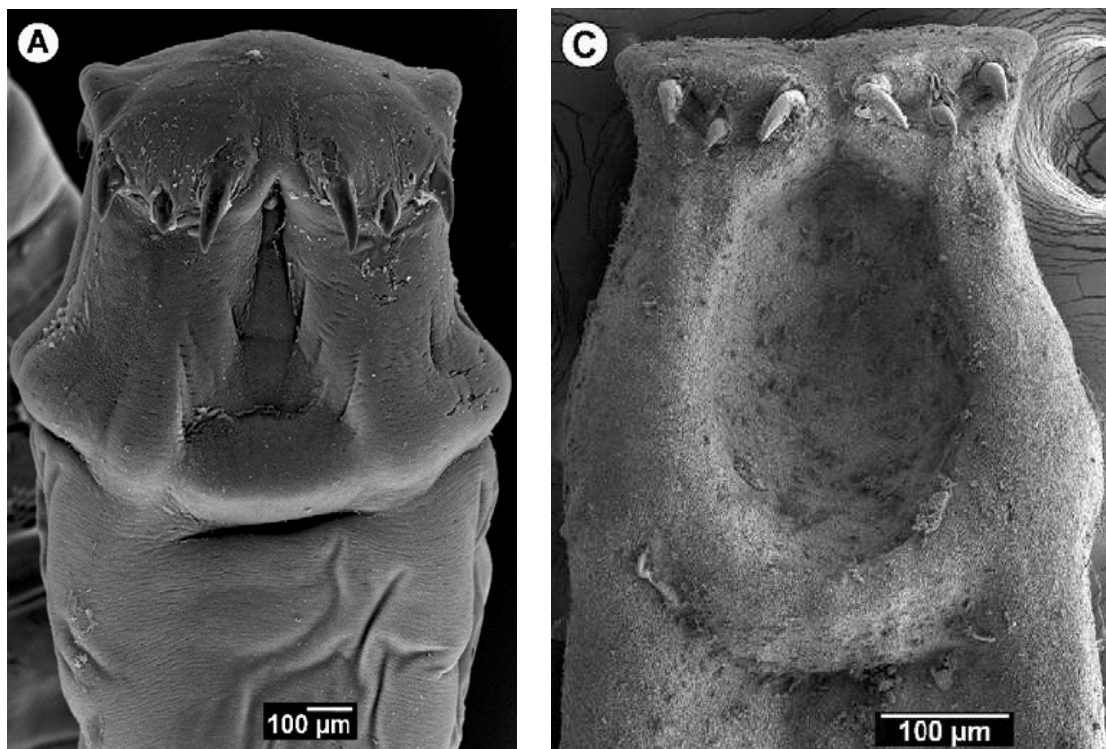


Fig. 22 - *Triaenophorus crassus* e *T. nodulosus* (Kuchta *et al.*, 2006)

PROVE DI INFESTAZIONE SPERIMENTALE DI CROSTACEI COPEPODI

Le osservazioni effettuate in laboratorio sulle prime fasi di sviluppo di *T. crassus* a partire dall'uovo hanno permesso di condurre diverse osservazioni morfologiche e di confrontare i nostri dati sperimentali con le descrizioni operate in passato (Kuperman, 1973; Shostak e Dick, 1989).

È stato così possibile rilevare come la presenza all'interno dell'uovo di un embrione mobile dotato di tre paia di uncini fosse evidenziabile dopo 3 giorni a 24°C e, solo qualche ora dopo, a 18°C.

La schiusa dell'uovo, con fuoriuscita del coracidio dotato di movimenti oscillatori e rotatori dapprima rapidi, poi progressivamente rallentati, si è osservata a partire dal 5° giorno ad entrambe le temperature.

Il coracidio presentava all'interno una larva esacanta circondata da uno spesso rivestimento di cellette di natura glicogenica, come già descritto da Kuperman (1973).



Fig. 23 - Uovo



Fig. 24- Coracidio

La percentuale di schiusa delle uova é risultata superiore al 95% al 6°giorno a 18°C, mentre a 24°C si é riscontrata una mortalità quasi totale dei coracidi nelle ore successive la schiusa. Le osservazioni condotte sui crostacei copepodi immessi al 6° giorno nei pozzetti mantenuti a 18°C e contenenti i coracidi, hanno permesso di rilevare l'ingestione di tutti i coracidi presenti da parte dei copepodi nell'arco di 24 ore.

Lo sviluppo della larva procercoide (Fig. 24) all'interno dei crostacei è stato rilevato a partire dalle 48 ore successive all'ingestione in oltre il 90% dei copepodi.

L'intensità di infestazione ha presentato valori variabili tra 1 e 18, con una media di 4 larve procercoidi/copepode.

La presenza, nella maggior parte dei soggetti infettati sperimentalmente, di 3-4 procercoidi/copepode rientra nei valori utili a garantire la sopravvivenza dell'ospite determinandone al contempo una minore motilità e, quindi, una maggiore suscettibilità alla predazione da parte dei pesci, mentre il raro riscontro di un numero elevato di procercoidi (nel nostro caso 18) risulterebbe controproducente nella trasmissione del ciclo determinando una maggiore mortalità dell'ospite ed una incompleta maturazione delle maggior parte delle larve procercoidi (Pasternak *et al.*, 1999).



Fig. 25 - Larva procercoide

In base all'elevata positività riscontrata nei coregoni esaminati nel 2005, nel corso del 2006 l'indagine è stata ampliata coinvolgendo un maggior numero di laghi con lo scopo di valutare la diffusione di *T. crassus* in particolare e di cestodi Triaenophoridae in generale, nella provincia altoatesina.

4. OPISTORCHIASI

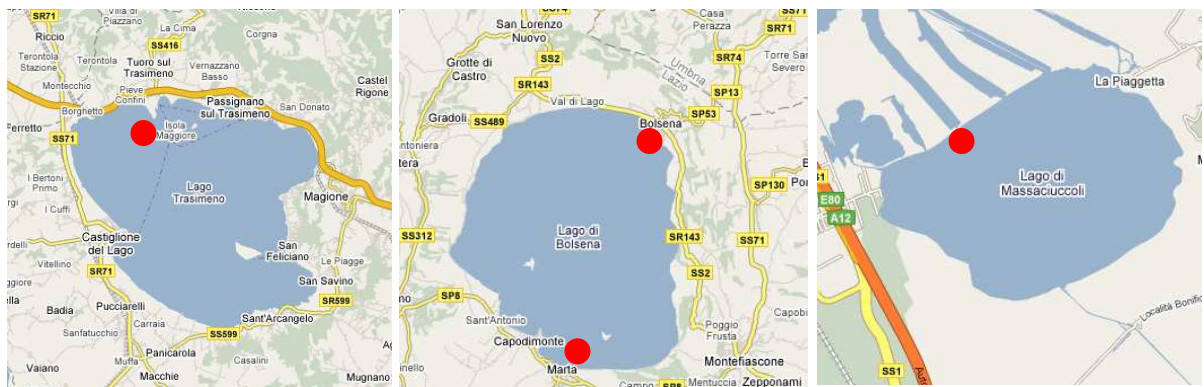
4.1 PREMESSA

La segnalazione nel 2003 di due casi umani di Opisthorchiasi, contratta a seguito del consumo di filetti di tinca marinata a freddo presso un ristorante presente nell'Isola Maggiore del Lago Trasimeno (Perugia) (Crotti *et al.*, 2004), seguita dal riscontro nel 2005 da parte dello stesso autore di un nuovo focolaio in 8 pazienti che avevano consumato tinca e carpa marinati presso lo stesso ristoratore, ci ha spinto ad intraprendere un'indagine epidemiologica sugli ospiti intermedi e definitivi coinvolti nel ciclo biologico del parassita in questo ambiente lacustre. In seguito alla successiva segnalazione di 20 nuovi casi umani nel 2007 sul lago di Bolsena (Viterbo) sono state condotte analisi parassitologiche anche su alcuni campioni ittici provenienti da questo lago.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 CAMPIONAMENTO

Nel periodo 2005-2007 l'indagine sugli ospiti coinvolti nel ciclo biologico di *O. felineus* (primi ospiti intermedi – molluschi gasteropodi, secondi ospiti intermedi – pesci, ed ospiti definitivi- mammiferi ittiofagi) ha riguardato inizialmente il Lago Trasimeno e successivamente, per quanto riguarda le specie ittiche si è allargata anche ai laghi di Massaciuccoli (PI) e Bolsena (VT) in collaborazione con i colleghi veterinari ed i servizi sanitari medici e veterinari presenti a livello locale.



Aree di campionamento

4.2.2 RICERCA DI STADI LARVALI DI *OPISTHORCHIS* SPP. NEL PRIMO OSPITE INTERMEDIO

Nel corso della ricerca sono stati effettuati 5 campionamenti (1 a febbraio 2005, 3 rispettivamente in maggio, luglio e settembre 2006 e 1 in febbraio 2007) volti alla ricerca di molluschi gasteropodi che potessero rivestire il ruolo di primo ospite intermedio nel ciclo biologico di *Opisthorchis* spp.

I gasteropodi sono stati prelevati dalle sponde dell'Isola Maggiore, dove erano stati registrati gli episodi umani, effettuando una raccolta da substrati sommersi quali foglie o sassi, manualmente e mediante retino da benthos nelle zone di maggiore profondità.



Durante la raccolta e fino all'arrivo in laboratorio i gasteropodi venivano posti in barattoli senz'acqua per evitare l'eventuale rilascio di cercarie durante il trasporto e mantenuti alla temperatura d'origine per tutta la durata del viaggio.

All'arrivo in laboratorio i soggetti venivano identificati morfologicamente, , posti singolarmente in pozzetti di piastre per colture cellulari e sottoposti per alcune ore a stress termico e luminoso, mediante lampada o esposizione al sole.

Le cercarie emesse venivano poste su un vetrino portaoggetto su cui veniva poi apposto un coprioggetto delicatamente per mantenere integro il parassita e poter effettuare le osservazioni morfologiche utili all'identificazione.

Successivamente i gasteropodi venivano soppressi e sottoposti ad esame parassitologico al microscopio ottico previo schiacciamento dei tessuti tra due vetrini.

4.2.3 RICERCA DI METACERCARIE DI *OPISTHORCHIS* SPP. NEL SECONDO OSPITE INTERMEDIO

Per la ricerca di metacercarie sono stati prelevati, presso le cooperative di pescatori di Passignano e Panicarola nel Lago Trasimeno e direttamente pescati dal lago, 244 soggetti appartenenti ad otto specie ittiche differenti, come riportato nella tabella seguente:

Specie Ittica	Nome Scientifico	Pesci campionati	Periodo
Tinca	<i>Tinca tinca</i>	177	Mag 2005 – Ott 2007
Persico	<i>Perca fluviatilis</i>	35	Nov 2005 – Lug 2007
Coregone	<i>Coregonus</i> spp.	10	Feb e Lug 2007
Scardola	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	8	Apr 2007
Boccalone	<i>Micropterus salmoides</i>	6	Ott 2005 – Feb 2007
Carassio	<i>Carassius carassius</i>	6	Sett 2006 e Apr 2007
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	1	Lug 2006
Cavedano	<i>Leuciscus cephalus</i>	1	Apr 2007
Totale		244	

Tab. 10 - specie ittiche campionate nel corso della ricerca

La specie prevalente è risultata la tinca, in quanto prodotto estremamente importante dal punto di vista commerciale in queste zone e imputata di essere la causa degli episodi di infestazione umana.

Dal Lago di Massaciuccoli nel corso del 2006 sono stati effettuati 2 campionamenti prelevando 12 esemplari di carassio, 5 scardole, 3 cefali, 2 carpe e 1 luccio con la collaborazione di un pescatore professionale.

Nel 2007 sono stati inoltre esaminati 5 esemplari di *T. tinca* prelevati presso le rivendite delle cooperative di pescatori di Marta (3 soggetti) e Bolsena (2 soggetti) del Lago di Bolsena (VT).

Tutti i campioni venivano trasportati all'interno di un contenitore refrigerato presso il



laboratorio dove venivano subito sottoposti ad esame parassitologico.

TECNICHE PARASSITOLOGICHE PER LA RICERCA DI METACERCARIE NEL PESCE

Su tutti i pesci campionati sono state condotte procedure specificatamente rivolte alla ricerca delle metacercarie eventualmente presenti nelle porzioni muscolari utilizzando due distinti protocolli: la compressione e la digestione del muscolo laterale.

Le fasi operative prevedevano in sintesi lo sfilettamento dei due muscoli laterali del pesce mediante l'utilizzo di un bisturi e previa ablazione della cute.

Le due porzioni muscolari così ottenute da ciascun pesce venivano poi esaminate in parte con la tecnica di compressione (Vichasri *et al.*, 1982) ed in parte con quella di digestione (Sithithaworn *et al.*, 1997).

La tecnica di compressione consiste nell'ulteriore filettatura del muscolo in strisce sottili di circa 1 mm di spessore che vengono successivamente poste tra due vetri compressori (fig. 26) ed analizzate allo stereomicroscopio al massimo ingrandimento per l'evidenziazione delle metacercarie che, una volta individuate, vengono isolate dal tessuto muscolare mediante aghi da dissezione.



Fig. 26 - Porzioni di filetto di tinca poste tra vetri compressori

La tecnica di digestione prevede il sezionamento dei filetti in porzioni di circa 1 cm per lato che vengono poste in un matraccio di vetro e sottoposte a digestione cloropeptica utilizzando la soluzione così composta: 7 g di pepsina e 4 ml di acido cloridrico in 1 litro di acqua deionizzata.

Il materiale viene miscelato mediante agitatore magnetico alla temperatura di 40°C overnight, filtrato con setaccio a maglie da 500 µm, in modo da trattenere

il materiale organico grossolano e far passare le eventuali metacercarie di nostro interesse, e analizzato prelevando un'adeguata quantità di materiale da osservare allo stereomicroscopio. In questo caso le metacercarie reperite si presentano già isolate dal tessuto muscolare.

Le metacercarie isolate venivano poste in soluzione fisiologica su vetrino e sottoposte all'osservazione microscopica per il rilevamento delle caratteristiche morfometriche utili all'identificazione, utilizzando le descrizioni di Wykoff *et al.* (1965), Miyazaki (1991) e Kaewkes (2003).

Oltre ai campioni di pesce fresco sono stati esaminati alcuni prodotti ittici trasformati, in particolare 3 tinche affumicate e 2 campioni di paté di tinca provenienti da una cooperativa di pesca del Trasimeno ed 1 campione di filetti di carpa marinati artigianalmente presso un ristorante dell'Isola Maggiore.

Tutti e 3 i campioni sono stati esaminati con il medesimo protocollo utilizzato per gli esemplari freschi.



Fig. 27- Tinca affumicata



Fig. 28 - Filetti di carpa marinata

4.2.4 RICERCA DI UOVA DI OPISTORCHIDI NELLE FECI DI MAMMIFERI ITTIOFAGI

Per quanto riguarda la ricerca di uova nei potenziali ospiti definitivi, sul territorio dell'Isola Maggiore dove si erano registrati i primi casi umani e risultava presente una nutrita colonia felina stanziale, sono stati raccolti 32 campioni fecali, 30 di gatto, 1 di cane ed 1 di nutria, per la ricerca di uova di *Opisthorchis* sp.

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% entro tre ore dalla raccolta, ed una volta portati al laboratorio si è proceduto all'esame coprologico

per sedimentazione e flottazione con successiva ricerca delle uova al microscopio ottico.

Inoltre si è avuta occasione di esaminare 5 campioni fecali di volpe raccolti dal terreno nelle zone circostanti il Lago di Massaciuccoli (PI) e



a noi inviati da colleghi dell'Università di Pisa che hanno anche provveduto a fornirci un fegato di gatto massivamente parassitato da opisthorchidi.

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il ciclo vitale di *Opisthorchis felineus* è complesso poiché presenta vari stadi larvali, tre differenti ospiti (due intermedi ed uno definitivo) e stadi riproduttivi sia asessuati che sessuati.

Sebbene questi parassiti possano presentare diverse generazioni dentro lo stesso stadio larvale, gli stadi larvali veri e propri sono cinque: miracidio, sporocisti, redia, cercaria, metacercaria, ed un sesto stadio che rappresenta la forma adulta del parassita. Ogni stadio del ciclo biologico del parassita è morfologicamente distinto dagli altri, e soddisfa unicamente le necessità che richiedono le condizioni ambientali in cui si trova ed il proprio ruolo nello sviluppo del parassita nella forma adulta (King e Scholz, 2001).

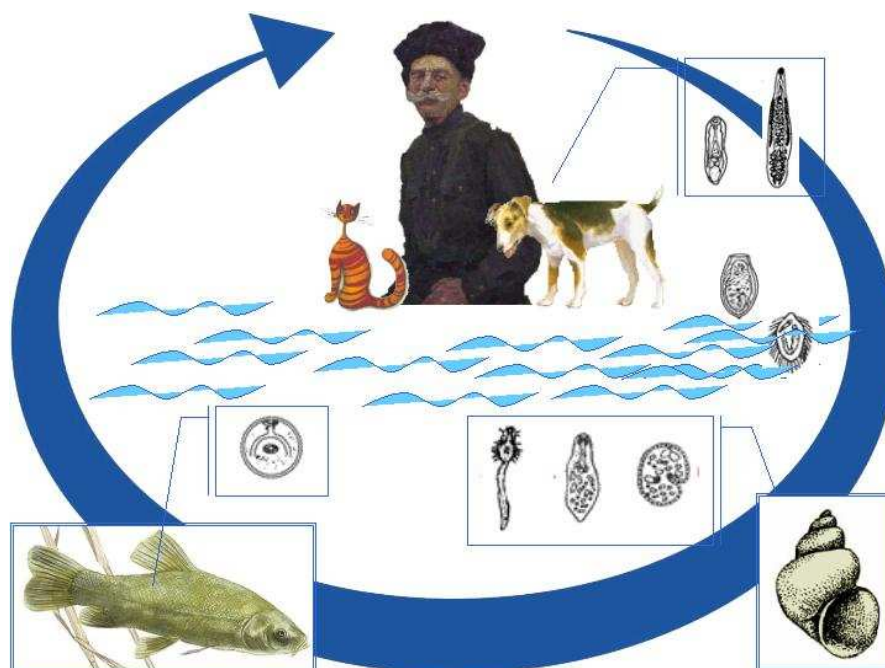


Fig. 29– Ciclo biologico di *O. felineus*

4.3.1 RICERCA DI STADI LARVALI DI OPISTHORCHIS SP. NEL PRIMO OSPITE INTERMEDIO

Per la ricerca dei primi stadi larvali di *O. felineus* nel Lago Trasimeno sono stati effettuati 5 campionamenti, 1 a febbraio 2004, 3 nel 2005 rispettivamente a maggio, luglio e settembre e 1 a febbraio 2007, col fine di raccogliere gasteropodi dalle sponde dell'Isola Maggiore.



Fig. 30 - Cercaria di *Plagiorchis* sp.

Sono stati recuperati 422 esemplari, di cui solo uno è risultato appartenere alla specie *Bithynia leachi*, descritta come ospite intermedio idoneo del parassita, mentre tutti i restanti 421 esemplari appartenevano a 7 specie diverse. Fra questi, solo da 2 esemplari campionati in luglio di



Fig. 31 - *Bithynia leachi*

Physella acuta, la specie predominante, si è osservata l'emissione di cercarie, comunque morfologicamente non ascrivibili ad *Opisthorchis felineus* ma al genere *Plagiorchis*. L'unico campione di *B. leachi* rinvenuto è risultato negativo per la presenza di cercarie.

Nella Tabella seguente sono indicate le 8 specie di molluschi gasteropodi rinvenute nel corso dell'indagine:

Specie di gasteropode	Famiglia	N soggetti esaminati
<i>Succinea</i> sp.	Succinaeidae	8
<i>Physa fontinalis</i>	Physidae	46
<i>Physella acuta</i>	Physidae	359
<i>Planorbis carenata</i>	Planorbidae	5
<i>Gyraulus acronicus</i>	Planorbidae	1
<i>Lymnaea balthica</i>	Lymnaeidae	1
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dreissenidae	1
<i>Bithynia leachi</i>	Bithynidae	1
Totale		422

Tab. 11 – specie di gasteropodi esaminate per la ricerca *Opisthorchis* sp.

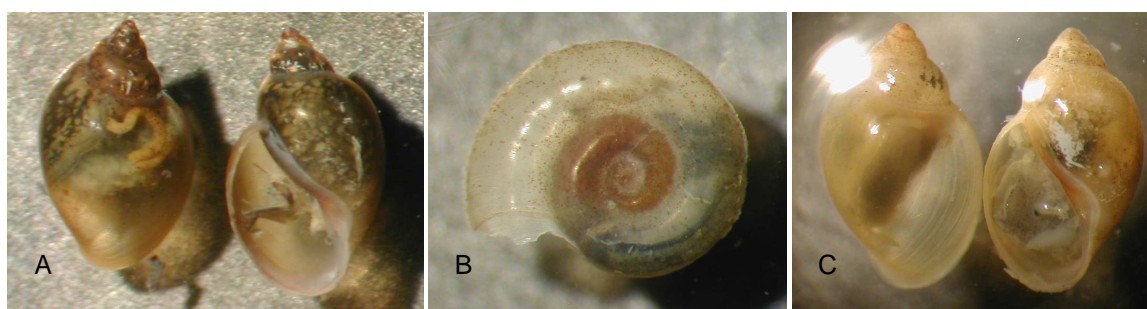


Fig. 32 – esemplari di gasteropodi campionati delle specie A) *P. acuta*, B) *P. carenata*, C) *P. fontinalis*

Per quanto concerne i risultati dei campionamenti di molluschi gasteropodi effettuati, va innanzitutto messo in evidenza come la negatività per cercarie riferibili ad *O. felineus* possa essere correlata al numero bassissimo di esemplari di *Bithynia leachi* individuato nel corso della ricerca. Infatti, dei 422 esemplari di gasteropodi raccolti, uno soltanto apparteneva a questa specie, considerata ospite idoneo per *O. felineus* in letteratura.

Seppur esiguo, il reperimento di esemplari di *B. leachi* rappresenta comunque un dato interessante perché conferma la presenza dell'ospite nel Lago Trasimeno, già segnalata in passato (Carollo, 1974), ma non più documentata, permettendo di ipotizzare la presenza di popolazioni di questi gasteropodi in areali del lago difficilmente raggiungibili con le metodiche da noi utilizzate per il campionamento. Va comunque posto in evidenza come un numero esiguo di gasteropodi parassitati sia in grado di mantenere attivo il ciclo del parassita in natura, in quanto gli individui parassitati sono in grado di emettere quotidianamente migliaia di cercarie infettanti; a tal proposito le prevalenze solitamente riscontrate nel corso di studi sulla diffusione degli stadi larvali di *Opisthorchis* sp. in molluschi gasteropodi sono risultate anche inferiori all'1% (Chai *et al.*, 2005).

Resta comunque da indagare, data l'assenza di dati a riguardo, l'eventuale esistenza di specie di gasteropodi diverse da *B. leachi* in grado di rappresentare primi ospiti intermedi idonei per *O. felineus* in Italia e quindi di mantenere attivo il ciclo biologico del parassita nel Lago Trasimeno. Tale ipotesi è da tenere in considerazione e va verificata non solo per questa specie parassitaria ma anche per l'introduzione di specie esotiche zoonosiche che possano trovare ambienti idonei al proprio sviluppo nel nostro territorio, ancor più se si pensa alle ultime introduzioni di specie esotiche di molluschi già segnalate in Florida (Chai *et al.*, 2005) ma anche nel Trasimeno, dove ad esempio *Dreissena polymorpha*, recentemente introdotta, è diventata attualmente una delle specie dominanti (Lancioni e Gaino, 2006).

Il rilevamento di 2 soggetti di *Physella acuta* (0,5% sul totale dei soggetti esaminati appartenenti a questa specie) positivi per cercarie di *Plagiorchis* sp. è stato effettuato solo nel mese di Luglio 2007, in corrispondenza di temperature molto elevate e di livelli dell'acqua del lago molto ridotti, indicando come anche per le cercarie di *Opisthorchis felineus* possa esistere una stagionalità in grado di influenzare fortemente le prevalenze nelle popolazioni di gasteropodi del Lago Trasimeno.

Per quanto riguarda il controllo della trasmissione della malattia a livello di primo ospite intermedio, sono stati portati avanti numerosi progetti in Cina, endemica per *C. sinensis*, riguardanti il controllo del numero delle chiocciole nell'allevamento di pesce nei ponds, ovviamente associato a trattamenti farmacologici delle persone infestate ed ad un'intensiva educazione sanitaria della comunità sul consumo di pesce crudo.

L'effetto sulla trasmissione della malattia in due anni è stato tale da avere una diminuzione della prevalenza nelle persone, ma comunque con un modesto impatto sulla popolazione di chiocciole ospiti intermedi, sull'abitudine di utilizzare feci umane come fertilizzante per stagni, e sull'usanza di molte persone di consumare pesce crudo (Chai *et al.*, 2005).

4.3.2 RICERCA DI METACERCARIE NEL SECONDO OSPITE INTERMEDIO

Su 244 soggetti di pesci dulciacquicoli sottoposti ad analisi parassitologiche, la presenza di metacercarie a livello del muscolo laterale è stata evidenziata in 14 soggetti (5,73%), tutti appartenenti alla specie *Tinca tinca*, come riportato nella tabella seguente.

Specie ittica	N. Soggetti Esaminati	N. Soggetti Positivi per metacercarie a livello muscolare	Percentuale Positività
Tinca	177	14	7,9%
Persico	35	0	-
Coregone	10	0	-
Scardola	8	0	-
Boccalone	6	0	-
Carassio	6	0	-
Carpa	1	0	-
Cavedano	1	0	-

Tab. 12 – specie ittiche esaminate per la ricerca di metacercarie di *Opisthorchis* sp.

Dei 14 soggetti di tinca risultati positivi per metacercarie a livello muscolare, solo uno ha presentato 2 metacercarie vitali di dimensioni di 280×200 µm ed ascrivibili ad *Opisthorchis felineus* (fig. 33), mentre 13 mostravano la presenza di metacercarie in regressione la cui identificazione su base morfologica non è risultata possibile.

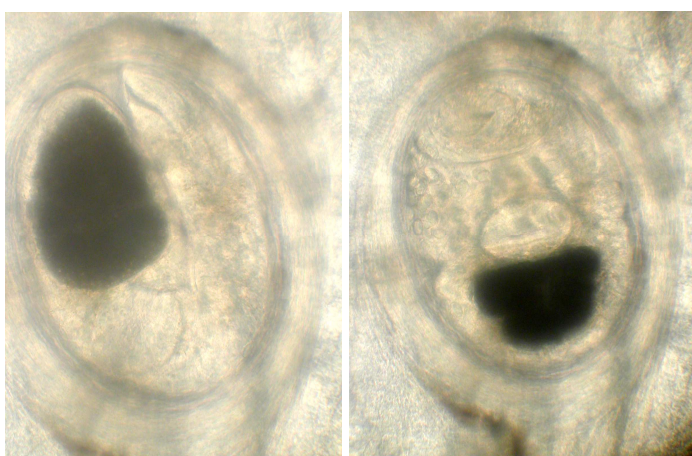


Fig. 33 - Metacercarie morfologicamente ascrivibili a *O. felineus*



Fig. 34 - Metacercaria in regressione

Dei 5 campioni di tinca prelevati presso le rivendite delle cooperative di pescatori del lago di Bolsena, ben 3 soggetti sono risultati positivi per la presenza di metacercarie ascrivibili alla specie *O. felineus*.

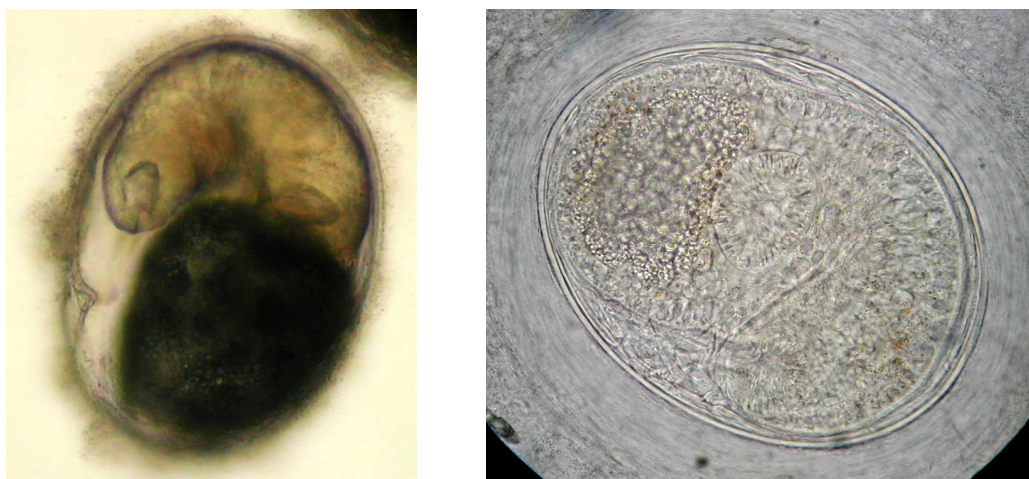


Fig. 35– metacercarie da tinca del lago di Bolsena ascrivibili ad *O. felineus*

Per quanto concerne la ricerca delle metacercarie del parassita nelle specie ittiche lacustri possibili secondi ospiti intermedi, si può notare come nel Lago Trasimeno si sia riscontrata un'unica positività per metacercarie di *O. felineus* in tinca (5,73%), con una prevalenza bassissima che appare in contrasto con i dati riportati in letteratura (Chai *et al.*, 2005), in base ai quali nelle aree endemiche si registrerebbero prevalenze a volte anche superiori al 90% nelle specie ittiche recettive.

Questo dato può essere spiegato in parte con le difficoltà diagnostiche insite in un'indagine di questo tipo, data l'estrema laboriosità delle tecniche di compressione e digestione e le dimensioni estremamente ridotte delle metacercarie che non ne consentono il rilevamento all'esame visivo. In base all'esperienza maturata nel corso della ricerca, dopo un primo approccio in cui si è applicata la tecnica di compressione, è seguita la conduzione sistematica della tecnica di digestione, che rappresenta senz'altro la metodologia di scelta quando si processano numerosi campioni con intensità d'infestazione estremamente basse (www.fibozopa.ria1.org), come da noi osservato nel caso

del Lago Trasimeno. Questo perché, oltre all'elevato numero di campioni esaminabili in contemporanea le metacercarie rilevate si presentano già isolate dal tessuto muscolare e sono già pronte per essere osservate, tenendo presente che l'identificazione di specie a questo livello richiede l'osservazione a fresco del campione per valutarne l'esatta morfologia ed il pattern di cellule a fiamma presente. Le cellule a fiamma sono le strutture deputate all'allontanamento delle escrezioni dal parassita grazie al loro movimento vibratile, percepibile solo in esemplari vitali e con estrema difficoltà, tanto che anche in letteratura il conteggio di tale pattern risulta discordante: qualche autore riporta $2[(5+6)+(6+6+6)]$ (Wykoff *et al.*, 1965), mentre per altri è $2[(6+6)+(6+6+6)]$ (Kaewkes, 2003). Quello di *O. viverrini* ad esempio è $2[(3+3)+(3+3+3)]$.

Da questi dati si può intuire la necessità, in mancanza di esemplari adulti, di approntare strumenti diagnostici molecolari che permettano l'identificazione a livello di specie in tempi relativamente brevi e che possa essere applicata anche alle uova e agli altri stadi larvali.

Alla luce della sporadica presenza di metacercarie riscontrata nella tinca, non va comunque in alcun modo scartata la possibilità che nel lago Trasimeno questa specie ittica rappresenti un ospite intermedio occasionale in presenza di un'altra specie ittica particolarmente idonea ma di scarso interesse commerciale e quindi non ancora indagata. Questa evenienza è stata riscontrata ad esempio in Estremo Oriente, dove la specie ittica ospite d'elezione è rappresentata da pesci del genere *Pseudorasbora* (Sithithaworn e Haswell-Elkins, 2003), anche da noi diffusi in diversi ambienti dulciacquicoli, compreso il Lago Trasimeno, in seguito ad operazioni di ripopolamento non controllate. Va comunque evidenziato come alcuni campioni di tinca esaminati siano risultati positivi per metacercarie in regressione che è stato impossibile classificare ma le cui dimensioni erano sovrapponibili a quelle di *O. felineus*.

Non si può infine escludere la possibilità che le tinche utilizzate per le preparazioni culinarie imputate della trasmissione della parassitosi all'uomo provenissero da altri laghi dell'Italia centrale.

A tal riguardo diversa è apparsa la situazione rilevata nel Lago di Bolsena, dove 3 delle 5 tinche esaminate sono risultate positive per *O. felineus* con elevate intensità d'infestazione. Nonostante questo campionamento non possa essere considerato significativo, le comunicazioni pervenuteci da parte di colleghi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, a cui sono pervenuti i campioni prelevati dalle Autorità Sanitarie Locali, hanno confermato l'elevata prevalenza ed intensità d'infestazione di *O. felineus* nelle popolazioni ittiche del Lago di Bolsena.

Per quanto riguarda i prodotti ittici trasformati, tutti negativi per metacercarie, va sottolineato come il paté di tinca venga pastorizzato e non presenti quindi rischi sanitari in quanto eventuali metacercarie vengono inattivate dalle alte temperature. Anche i prodotti affumicati in modo semi-industriale vengono trattati a caldo, con inattivazione delle metacercarie. Le tecniche di affumicatura utilizzate presso le cooperative di pescatori del lago permettono infatti il raggiungimento di temperature a cuore del prodotto molto elevate (80°C). Oltre alle alte temperature anche le temperature di congelamento sono in grado di inattivare le metacercarie, come indicato nel dettaglio nel Capitolo 6.

I prodotti ittici marinati, affumicati a freddo o in carpaccio devono quindi essere considerati fra le preparazioni maggiormente a rischio per la trasmissione della parassitosi all'uomo, come riferito nell'anamnesi di tutti i casi umani diagnosticati in Italia.

Va comunque puntualizzato come in generale le metacercarie di opistorchidi e heterofidi presentino un'elevata resistenza alle alte e basse temperature, richiedendo una particolare attenzione al raggiungimento ed al mantenimento delle temperature necessarie ad inattivare le metacercarie "a cuore" del prodotto, a differenza di altri parassiti ittici zoonosici più suscettibili a questi metodi di controllo, come ad esempio le larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium latum*.

4.3.3 RICERCA DI UOVA DI OPISTORCHIDI NELLE FECI DI MAMMIFERI ITTIOFAGI

In base alla letteratura, un individuo adulto di *O. felineus* è in grado di eliminare migliaia di uova ed è per questo che la ricerca di queste mediante esame coprologico per sedimentazione o flottazione è un facile ed idoneo strumento diagnostico per questa parassitosi nell'ospite definitivo.

L'indagine epidemiologica svolta nei 3 anni della ricerca ha portato ad individuare nell'Isola Maggiore del Lago Trasimeno, sede delle prime 2 infestazioni umane, una delle zone a rischio in cui andare a valutare la presenza del parassita adulto, data la nutrita colonia felina stanziale presente sull'isola. Sono stati raccolti quindi nel corso di un campionamento nel 2005, 30 campioni fecali di gatto, 1 campione riconducibile all'unico cane presente tutto l'anno sull'Isola e 1 campione di nutria raccolto sulle sponde del lago. L'esame coprologico ha riscontrato una notevole percentuale di positività (23,3%) per uova di *Opisthorchis* spp. con 7 campioni di gatto positivi sui 30 esaminati, indicando il ruolo svolto da questi animali come serbatoio della parassitosi sul Lago Trasimeno. I campioni fecali di cane e nutria sono risultati invece negativi.

Parallelamente sono state effettuate analisi parassitologiche di feci di gatto prelevate presso l'isola Maggiore anche da Crotti (2007), evidenziando percentuali di positività per uova di *Opisthorchis* spp. Analoghe a quelle da noi evidenziate.

Alla luce del fatto che nel 2004 erano stati effettuati interventi terapeutici di massa con Praziquantel sulle colonie di gatti dell'Isola Maggiore da parte dei veterinari dell'AUSL di Perugia, le osservazioni relative al rinvenimento di positività così elevate nelle stesse popolazioni feline hanno fatto supporre la persistenza di condizioni che permettano la trasmissione della parassitosi agli animali (in particolare alimentazione a base di scarti di pesce di lago parassitato).

Inoltre l'esame coprologico effettuato su 5 campioni fecali di volpe raccolti presso il Lago di Massaciuccoli (PI) ha permesso di individuare 1 campione positivo per uova di *Opisthorchis* spp.

L'identificazione delle uova reperite nelle feci di gatto e volpe su base morfologica ha però permesso solo di ascriverle al genere *Opisthorchis*, mentre per una loro classificazione a livello di specie si è reso necessario un approfondimento di tipo molecolare mediante PCR che al momento è ancora in fase di messa a punto.

Alcuni autori in passato hanno effettuato differenziazioni morfologiche delle uova di opisthorchidi e di heterofidi utilizzando la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM), adducendo il motivo, pienamente condivisibile, che le dimensioni delle uova di questi parassiti presentano un'estrema variabilità dipendente dalla popolazione parassitaria di origine ma soprattutto dalle metodiche di fissazione e dalle tecniche di misurazione. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare alcuni caratteri utili all'identificazione, ma tale procedura, per ammissione degli stessi autori (Ditrich *et al.*, 1990) rappresenta una metodica inapplicabile nella routine diagnostica.



Fig. 36 - uova di *Opisthorchis* spp. isolate rispettivamente da uomo (Crotti *et al.*, 2004) e da gatto e volpe

I dati relativi alla presenza di uova di *Opisthorchis* spp. in mammiferi ittiofagi non umani nelle province di Perugia e Pisa confermano sostanzialmente la diffusione di questo parassita zoonosico in ospiti definitivi domestici e selvatici dell'Italia centrale, indicando la presenza endemica di *O. felineus* in queste zone fin dalle prime descrizioni effettuate alla fine dell'800 da Rivolta (1884).

La comparsa dei primi casi umani di Opisthorchiasi in Italia, i primi nel 2003 (Crotti *et al.*, 2004) gli altri due episodi nel corso del periodo di ricerca, con numerose persone coinvolte in entrambi i casi, ha lanciato un campanello d'allarme su una zoonosi che probabilmente solo il consumo di prodotti ittici crudi e marinati ha fatto emergere nonostante l'agente eziologico fosse presente da secoli sul territorio nazionale. Inoltre il rinvenimento di un fegato di gatto proveniente dalla provincia di Pisa massivamente infestato da esemplari di *Opisthorchis* sp. (Fig. 37) ha rappresentato un'ulteriore conferma della diffusione del parassita in tutto il territorio dell'Italia centrale.



Fig. 37 - Esemplare adulto di *O. felineus* isolato da fegato di gatto e colorato con Carminio acido

L'Opisthorchiasi da *O. felineus* e *O. viverrini*, assieme alla Clonorchiasi da *C. sinensis*, rappresenta la principale zoonosi ittica da trematodi digenei a tropismo epatico ("liver flukes") (King e Scholz, 2001). Si stima che siano circa 17 milioni le persone infestate da queste tre specie parassitarie, di cui 7 milioni infestati da *C. sinensis* (Sithithaworn e Haswell-Elkins, 2003), 9 da *O. viverrini* (Sithithaworn *et al.*, 1997; Wongratanacheewin *et al.*, 2003) di cui 7 milioni solo in Thailandia (Upatham e Viyanant, 2003) e i rimanenti da *O. felineus* (Chai *et al.*, 2005).

Alla fine del secolo scorso si stimava intorno ai 290 milioni il numero di persone a rischio di contrarre queste parassitosi a livello mondiale (Rim *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda l'Opisthorchiasi da *O. felineus*, caratterizzata da una distribuzione geografica "limitata" all'Europa orientale, alla Siberia e all'Asia minore, con sporadiche segnalazioni in Europa Centrale, le persone attualmente "a rischio" infestazione sono stimate intorno a 12 milioni (Keiser e Utzinger, 2005) con 1,6 milioni di persone parassitate (Yossepowitch *et al.*, 2004).

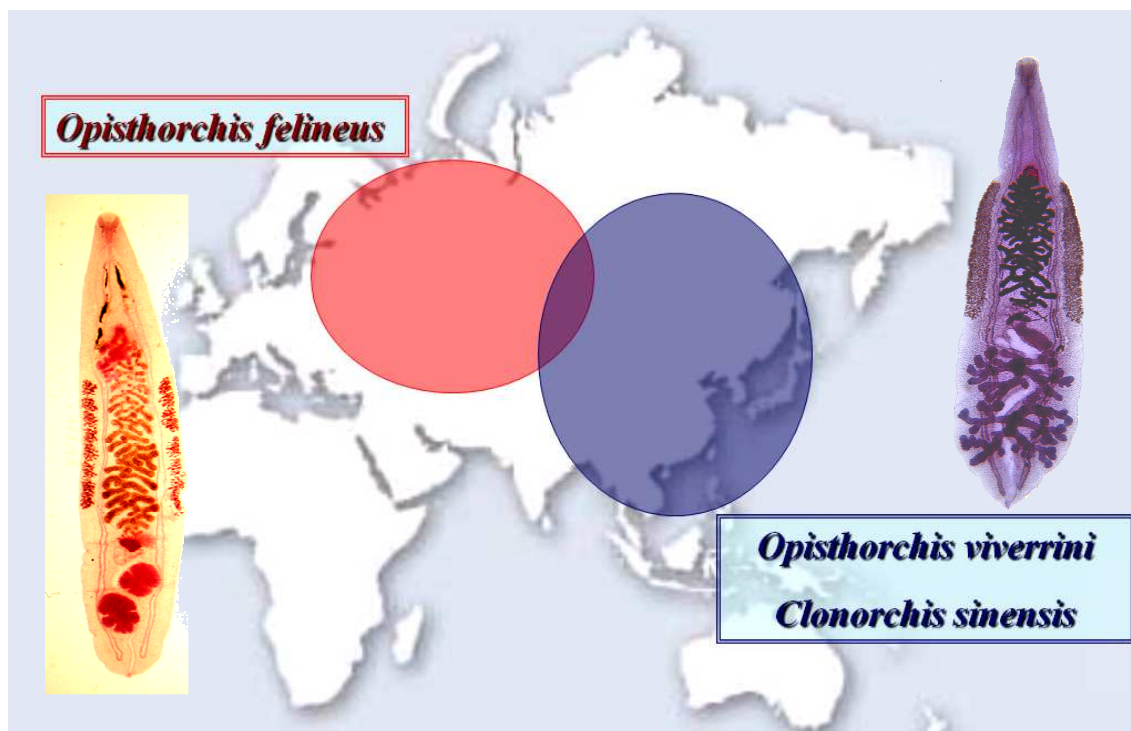


Fig. 38 - Aree endemiche per trematodi epatici zoonosici

Più in dettaglio, *O. felineus* è un parassita presente in varie regioni dell'est e del sudest europeo, in Turchia ed in tutti i territori della federazione russa eccetto la parte più settentrionale della Siberia e le regioni più orientali (Chai *et al.*, 2005).

La zona dove il parassita risulta essere più presente è la Siberia occidentale, nelle valli tra i fiumi Ob ed Irtysh ed i loro affluenti; dove la prevalenza dell'infestazione umana varia dal 40% al 95%. Prevalenze molto alte si riscontrano in molte altre aree del paese e Kazakistan ed Ukraina sono

fortemente interessati dalla parassitosi (Kumar, 1999; Yossepowitch *et al.*, 2004).

Tra i paesi dell'Unione Europea in cui è segnalata la presenza seppur sporadica del parassita ricordiamo Spagna, Italia, Albania, Grecia, Macedonia, Svizzera, Germania, Polonia, alcune regioni del Caucaso (Sithithaworn e Haswell-Elkins, 2003; Tselepatiotis *et al.*, 2003), Olanda (Kumar, 1999) e Francia (Boch e Supperer, 1980).

In Italia fino ai primi casi umani del 2003 (Crotti *et al.*, 2004) vi erano state sporadiche segnalazioni della parassitosi solo a carico di gatti e cani fin dalla fine dell'800, tanto che la prima descrizione del parassita (che venne chiamato *Distoma felineum*) viene riconosciuta a Rivolta (1884) che lo isolò da tre gatti e due cani in Toscana nel periodo dal 1880 al 1883. Successivamente altre segnalazioni vennero riportate da Perroncito (1901) che lo considerava estremamente comune nel territorio di Pisa e suggeriva di verificarne la presenza anche nell'uomo cominciando da pazienti cirrotici, e da Botti (1955), in un cane proveniente sempre dalla provincia di Pisa.

L'aumentato numero di rotte internazionali, la maggiore facilità di migrazione di popolazioni e merci ha significato anche un maggior numero di casi di opisthorchiasi in aree dove la malattia non era endemica, come ad esempio il Nord-America. Parecchi studi dimostrano come uova di *Opisthorchis* siano state trasportate da immigrati che presentavano una infestazione cronica o da residenti che avevano contratto l'infestazione durante viaggi in aree di endemia (Yossepowitch *et al.*, 2004).

Queste movimentazioni non dovrebbero causare comunque lo stabilizzarsi della malattia in aree dove mancano ospiti intermedi idonei come la *Bithynia*, ma rende difficile la diagnosi ed il trattamento a quei medici per i quali la patologia non è familiare (Yossepowitch *et al.*, 2004).

L'infestazione nell'uomo di solito è conseguente a consumo di pesce crudo (Preuksaraj, 1984; Urquhart, 2001), sotto sale (Yossepowitch *et al.*, 2004), essiccato o marinato (Chai *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda il rapporto tra intensità di infestazione e la gravità della sintomatologia, sembra che ci sia una correlazione direttamente proporzionale tra i due aspetti e che in aree altamente endemiche vi sia anche un maggior numero di persone che manifesta segni clinici rilevanti (Kumar, 1999).

L'infestazione da *Opisthorchis* causa nell'uomo e negli altri animali colangite catarrale delle vie biliari (Boch e Supperer, 1980; Sripa *et al.*, 2003), pericolangite con iperplasia e desquamazione dell'epitelio a cui seguono formazioni papillomatose ed adenomatose, nonché infiltrazione del tessuto connettivo della parete. Queste alterazioni si manifestano solo nelle vie biliari di calibro medio-grande, sede d'elezione del parassita (Acha e Szyfres, 2003).

Il fegato si mostra aumentato di volume, con le vie biliari dilatate ed ectasiche fino ad assumere aspetto noduloso (fig. 38). Anche la cistifellea si presenta dilatata, con una infiammazione che tende a cronicizzare e con la possibilità di originare carcinoma (Boch e Supperer, 1980; Acha e Szyfres, 2003).

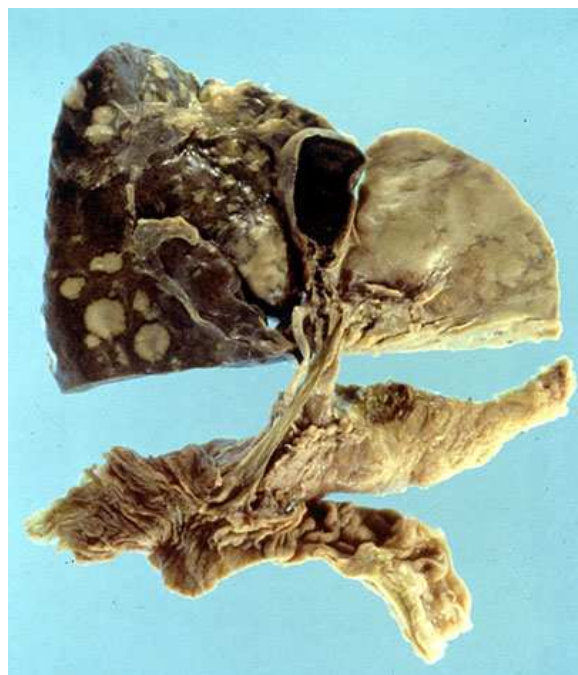


Fig. 38 - Opisthorchiasi umana: aspetti anatomopatologici

Le alterazioni epatiche portano nello stadio cronico ad avere cirrosi epatica ed alterazioni pancreatiche (Krauss *et al.*, 2003). La gravità della sintomatologia dipende sempre dal numero di parassiti presenti e dalla durata dell'infestazione.

Di solito asintomatica, può manifestarsi con febbre, diarrea, ittero moderato, astenia, cefalea, epatomegalia e congestione splenica (Acha e Szyfres, 2003), fino ad ostruzione meccanica delle vie biliari con conseguente stasi, associata molto spesso ad infezioni batteriche secondarie, che portano a colangiti, colangioepatiti ed alla formazione di micro e macro ascessi o di calcoli biliari e conseguenti dolori colici (Acha e Szyfres, 2003; Chai *et al.*, 2005). Altri sintomi

riscontrabili sono asma bronchiale e lesioni allergiche, soprattutto nel corso del primo periodo di infestazione (Chai *et al.*, 2005), ma anche anemia, disturbi digestivi (Boch e Supperer, 1980), edemi, ascite (Boch e Supperer, 1980), eosinofilia (Sithithaworn e Haswell-Elkins, 2003; Tselepatiotis *et al.*, 2003), tossiemia per alterazione della funzionalità epatica (Belding, 1965), linfoadenopatia e rash cutanei (Mairiang e Mairiang, 2003); oltre a questi sintomi ci sono prove di una nefropatia cronica da nefriti e pielonefriti spesso associata a questa malattia, assieme a discinesia del sistema urinario ed alterazioni dell'interstizio con un'insufficienza renale cronica. L'insufficienza renale acuta si presenta con ittero da ostruzione che si instaura in seguito colangiocarcinoma (Sripa, 2003).

Si ritiene inoltre che *Opisthorchis* spp. possa avere un ruolo determinante nella formazione di carcinomi a livello epatico, più frequentemente colangiocarcinomi (Acha e Szyfres, 2003; Sripa *et al.*, 2003), correlazione già comunque nota fin dall'inizio del secolo scorso, come indicato da Botti (1955).

A livello istologico si possono rilevare fenomeni di neoformazione del tessuto epiteliale ad aspetto blastomatoso da irritazione cronica, necrosi ed atrofia del tessuto epatico, con estesa formazione di tessuto connettivo fibroso (Botti, 1955; Belding, 1965).

In caso di infestazioni massive, si può avere invasione del pancreas con conseguente infiammazione catarrale dei dotti pancreatici (Acha e Szyfres, 2003).

Negli animali infestati, gatti e cani *in primis* ma anche mammiferi ittiofagi selvatici, i segni clinici sono di solito inapparenti, con ipereosinofilia poco pronunciata, e si manifestano solo in presenza di intensità d'infestazione elevate (Oliveira *et al.*, 2005); in linea di massima sono comunque sovrapponibili a quelli evidenziabili nell'uomo.

Molto efficace risulta la descrizione della patologia effettuata da Sripa e Kaewkes (2002) e da Sripa (2003) sui reperti patologici ed istopatologici rilevati nel corso di un'infestazione sperimentale di un criceto (*Mesocricetus auratus*) e di cui si forniscono di seguito alcune suggestive immagini.



Fig. 40 - Epatomegalia e congestione con dilatazione ed ispessimento della pareti della cistifellea in criceto infestato da *O. viverrini* (Sripa, 2003)

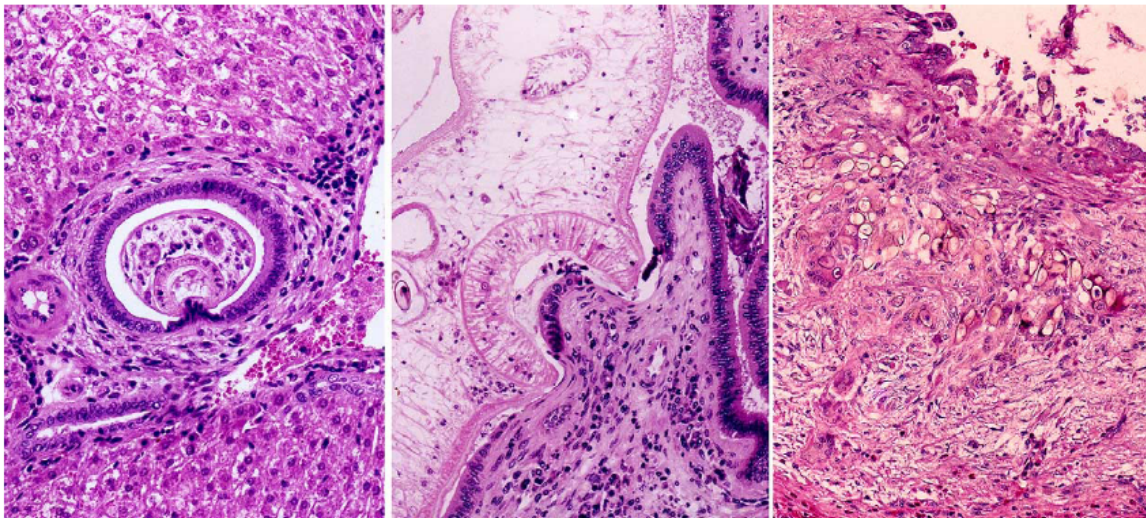


Fig. 41 - Lesioni meccaniche da *O. viverrini* all'interno dei dotti biliari in *M. auratus* e, nella foto a destra, reazione granulomatosa a livello epatico periduttale attorno alle uova del parassita in un'infestazione umana (Sripa, 2003)

La diagnosi di Opisthorchiasi si basa essenzialmente sull'anamnesi, sui segni clinici, sull'area geografica e sul riscontro delle uova opercolate di colore giallo bruno nelle feci (Woo, 1995; Krauss *et al.*, 2003; Bernieri *et al.*, 2002; Ditrich *et al.*, 1992). La ricerca delle uova viene condotta tramite tecniche di sedimentazione.

Secondo Acha e Szyfres (2003) le uova di *Opisthorchis* sono molto pesanti (peso specifico:1.2814) e non danno origine a flottazione in una soluzione satura di nitrato di sodio, che presenta un peso specifico decisamente superiore; l'esperienza personale ha constatato che il peso specifico delle uova consentono una buona flottazione anche utilizzando la soluzione 1300.

A livello sperimentale sono stati sviluppati test PCR da applicare direttamente alla matrice. Nei soggetti infestati da un elevato numero di vermi, l'ecografia e la TAC sono risultate utili a rilevare un aumento delle dimensioni del lobo sinistro del fegato ed una disfunzione della cistifellea. All'esame ecografico i vermi adulti possono comunque essere confusi con calcoli biliari (Rondanelli *et al.*, 2005).

In diagnosi differenziale vanno considerati altri trematodi epatotropici, ma anche altre patologie delle vie biliari e del fegato sostenute da altre cause (Krauss *et al.*, 2003).

La terapia di questa patologia è molto semplice e riconosce quale farmaco d'elezione il praziquantel (Quinn *et al.*, 1997; King e Scholz, 2001; Jongsuksuntigul e Imsomboon, 2003; Chai *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2007), alla dose di 25 mg/kg, tre volte al giorno per due o tre giorni (Woo, 1995; Mairiang e Mairiang, 2003; Chai *et al.*, 2005).

Esistono altri farmaci utilizzati per la terapia, come per esempio il mebendazolo, somministrato in dosi di 30 mg per 21 o 28 giorni, con una buona percentuale di inattivazione del 94 e 89 % rispettivamente (Mairiang e Mairiang, 2003). Anche l'albendazolo può essere utilizzato ma con una percentuale di inattivazione del 63 % (Mairiang e Mairiang, 2003).

Nella prevenzione e controllo di questa patologia gioca un ruolo fondamentale l'abitudine di consumare piatti con pesce crudo o comunque poco cotto che, conseguentemente, consente il mantenimento della parassitosi nelle aree di endemia, unitamente alla mancanza di idonei metodi di canalizzazione fognaria e trattamento dei reflui.

Per quanto concerne il lago Trasimeno ed il lago di Bolsena, le Autorità Sanitarie Locali hanno emanato Ordinanze specifiche che vietano la vendita ed

il consumo (presso i ristoratori locali ed i privati) di specialità culinarie a base di pesci di lago crudi o poco cotti. E' stata inoltre recentemente emanata (27/02/2008) a livello nazionale una nota informativa del Ministero della Salute su "Emergenza dell'opisthorchiasi nell'Italia centrale" che suggerisce di imporre nella commercializzazione controllata dei prodotti a rischio l'indicazione "da consumarsi previa cottura o congelamento a -20°C per una settimana, similmente a quanto già adottato per il Lago Trasimeno in cui tali indicazioni sono state impartite ai ristoratori e agli stabilimenti di trasformazione dei prodotti ittici in autocontrollo mediante una circolare dell'AUSL di Perugia.

In relazione alle strategie di controllo ed alla prevenzione dell'opisthorchiasi applicate alle popolazioni delle aree a forte endemia, quali quelle del sud-est asiatico, si sono effettuati esami delle feci e trattamenti dei positivi con praziquantel (Chai *et al.*, 2005), cercando parallelamente di attuare un'educazione sanitaria rivolta principalmente all'alimentazione (Jongsuksuntigul e Imsomboon, 2003) ed al miglioramento delle condizioni igieniche mediante costruzione ed utilizzo di latrine nelle aree endemiche (Jongsuksuntigul e Imsomboon, 2003; Chai *et al.*, 2005).

Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha raccomandato la chemioterapia di massa per le persone che vivono nelle aree di endemia come principale metodo di prevenzione e come strategia di controllo. La chemioterapia di massa con il praziquantel (40 mg/kg in singola dose) è molto efficace ed è anche facile la sua distribuzione. Purtroppo, come è stato già detto in precedenza, il parassita può completare il proprio ciclo biologico all'interno di diverse specie animali ittiofaghe, quindi applicare la chemioterapia di massa solo alla popolazione umana non è sufficiente ad impedire il mantenimento del ciclo del parassita all'interno di serbatoi non umani.

Come ben descritto da Keiser e Utzinger (2005), sono numerosi i fattori che possono influenzare positivamente o negativamente la realizzazione del ciclo biologico dei trematodi digenei zoonosici. Nell'immagine successiva (Fig. 42) vengono indicati i principali fattori che possano favorire l'instaurarsi del ciclo

biologico di questi parassiti e quelli che possono permettere un controllo della parassitosi nell'uomo.

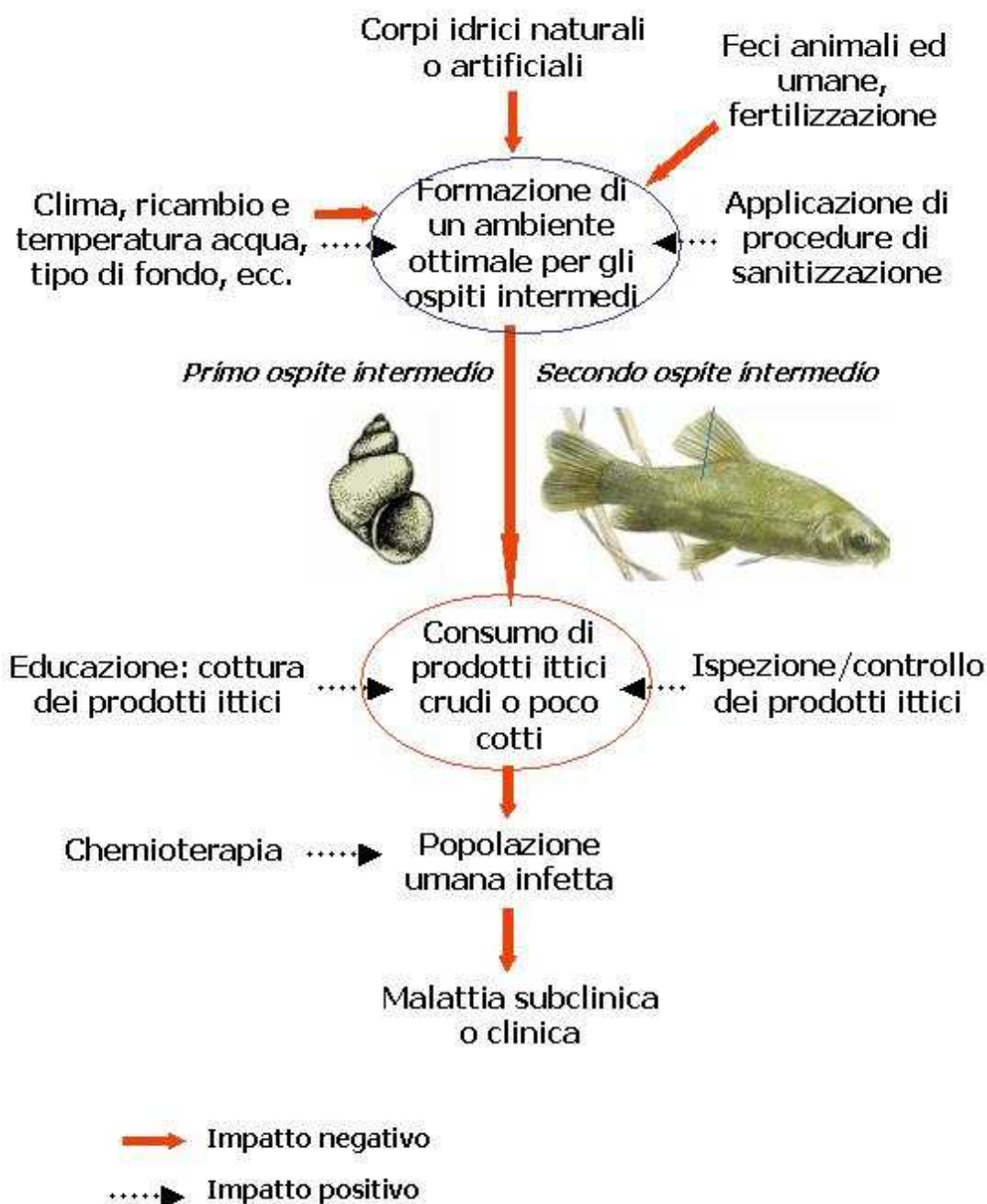


Fig. 42 – Fattori di influenza sulla diffusione delle zoonosi parassitarie di origine ittica sostenute da trematodi digenei

5 INFESTAZIONI DA TREMATODI DIGENEI HETEROPHYIDAE

5.1 PREMESSA

Nel corso del 2005 si è avuta l'opportunità di sottoporre ad analisi parassitologica alcuni soggetti di *Aphanius fasciatus* (Osteichthyes: Cyprinodontiformes), comunemente denominato “nono”, prelevati presso le Saline di Cervia (Emilia-Romagna) da colleghi del Corso di Laurea in Acquacoltura ed Ittiopatologia dell'Università di Bologna per studiare la possibilità di un utilizzo di questa specie ittica protetta per la lotta biologica alle zanzare. Il riscontro della presenza di numerose metacercarie di trematodi digenei nella cavità viscerale della maggior parte dei pesci esaminati ha dato spunto a ricerche volte alla loro identificazione ed alla definizione del loro eventuale ruolo patogeno sull'ospite pesce e del loro possibile ruolo zoonosico.



Aphanius fasciatus
www.provincia.venezia.it



Foto aerea e cartina dell'areale di campionamento

Le acque della salina, a causa della loro elevata salinità, ospitano un numero limitato di specie ittiche, che entrano attraverso il canale immissario e quello emissario che pongono in collegamento le saline con il mare.

Attraverso questi canali, i pesci giungono nel canale circolatorio, che ha la stessa salinità (circa 35%) dell'acqua del mare, e quando trovano le chiuse aperte possono penetrare fino all'interno dei bacini evaporanti. Fra le specie

ittiche qui presenti, possiamo trovare il latterino (*Atherina boyeri*), l'anguilla (*Anguilla anguilla*), varie specie di mugilidi ed il nono. Il nono rappresenta un anello biologico fondamentale per l'ecosistema delle saline di Cervia. Questo piccolo pesce striato, che riempie tutti i bacini di prima evaporazione, può sopravvivere in acque fino a quattro volte più salate rispetto a quelle del mare. Superata una certa soglia di salinità e di temperatura, diventa però facile preda per diverse specie di uccelli (www.salinadicervia.it).

5.2 MATERIALI E METODI

In seguito alle prime osservazioni condotte nel 2005, durante il biennio 2006-2007 sono stati prelevati mediante elettrostorditore 35 soggetti di *Aphanius fasciatus* nel corso di 6 campionamenti (2 nel 2006 per un totale di 9 soggetti e 4 nel 2007 per un totale di 27 soggetti). Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame parassitologico completo secondo la SOP MIPAV ITT 10.01.02 (vedi Allegato I).

Inoltre in collaborazione con l'Università di Bari sono stati esaminati, con le stesse modalità applicate ai precedenti soggetti, 4 esemplari di *A. fasciatus* provenienti dalle saline di Manfredonia.

I parassiti reperiti venivano isolati, mantenuti in soluzione fisiologica e sottoposti ancora vitali, dapprima incistati e successivamente excistati con aghi da dissezione, alle osservazioni morfologiche mediante stereomicroscopio e microscopio ottico. Terminate le osservazioni a fresco i parassiti venivano successivamente fissati in alcool 70° per la conduzione di ulteriori studi morfologici, mediante chiarificazione in glicerina e misurazione alla camera lucida, e molecolari.

Otto esemplari di *A. fasciatus* sono stati fissati *in toto*, previa apertura longitudinale ventrale della cavità addominale, in formalina tamponata al 10% per la conduzione dell'esame istologico.

Alla luce dei primi risultati, che indicavano il reperimento di una specie parassitaria non ancora descritta, si sono pianificate prove di infestazione sperimentale che potessero permettere lo studio morfologico dello stadio adulto

del parassita, indispensabile per la descrizione e l'identificazione di specie. A tale scopo, nel 2007 i visceri parassitati di 4 soggetti di *A. fasciatus* venivano somministrati a 4 anatroccoli di pochi giorni d'età stabulati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Forlì, non prima di aver eseguito un controllo parassitologico delle feci degli animali in modo da poter escludere qualsiasi infestazione parassitaria preesistente.

Gli anatroccoli venivano successivamente alimentati a mangime commerciale e controllati a partire dal 2° giorno post-infezione mediante esame parassitologico delle feci per sedimentazione e flottazione. Al momento del rilevamento di uova di trematodi digenei nelle feci, i soggetti sono stati sottoposti ad eutanasia e sottoposti ad esame parassitologico completo con particolare attenzione all'apparato digerente. Porzioni di intestino venivano inoltre fissate in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione dell'esame istologico. I parassiti rilevati venivano isolati dal contenuto intestinale e fissati in alcool 70° per le successive analisi morfologiche e molecolari.

Alcuni soggetti venivano chiarificati in glicerina, colorati con Carminio boracico e montati in modo permanente utilizzando Pertex Mounting Medium.

Alcuni soggetti venivano inoltre processati per la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) attraverso passaggi seriali in alcool 80°, 90°, 3 passaggi in alcool 100°, disidratazione mediante esametildisalazano, metallizzazione in oro ed osservazione con microscopio Jeol 5100.

5.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 35 *Aphanius fasciatus* provenienti dalle saline di Cervia, 29 soggetti (82,9%) sono risultati positivi per la presenza di metacercarie della specie parassitaria in studio. In tutti gli esemplari positivi le metacercarie sono state trovate a livello delle sierose viscerali e negli organi interni, ad eccezione di 3 soggetti in cui sono state reperite anche alla base degli archi branchiali.

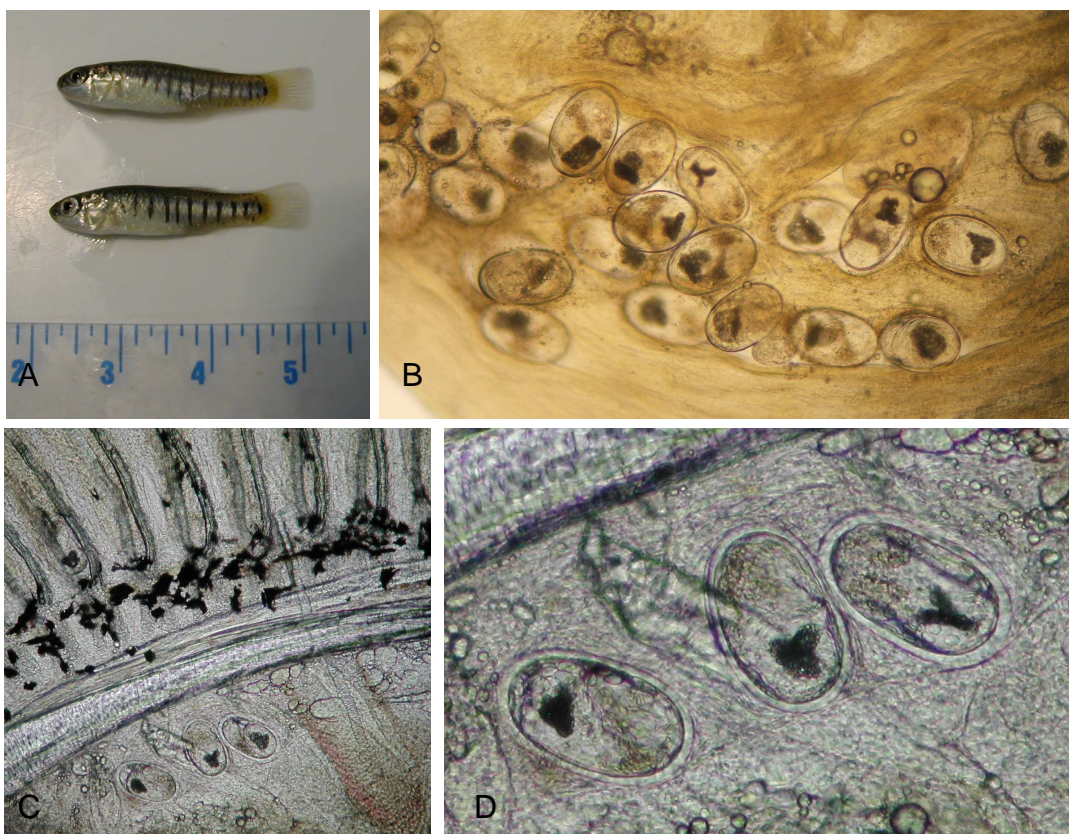


Fig. 43 – A) esemplari di *A. fasciatus*; B) Metacercarie localizzate a livello delle sierose viscerali e alla base delle branchie C) e D)

In tutti gli esemplari esaminati le intensità di infestazione sono sempre risultate molto elevate con un numero di metacercarie sempre superiore alle 100 unità. Nonostante questo i pesci all'osservazione *in vivo* si presentavano in buono stato di nutrizione e, quando adulti, in normale stato di maturità sessuale. Anche i 4 soggetti provenienti da Manfredonia, tutti positivi per metacercarie della stessa tipologia, mostravano valori analoghi di intensità d'infestazione.

Le metacercarie incistate isolate allo stereomicroscopio ed al microscopio ottico si presentavano di forma ovale, tutte vitali e all'interno erano ben visibili le caratteristiche evidenziate nella tavola seguente (Fig. 44).

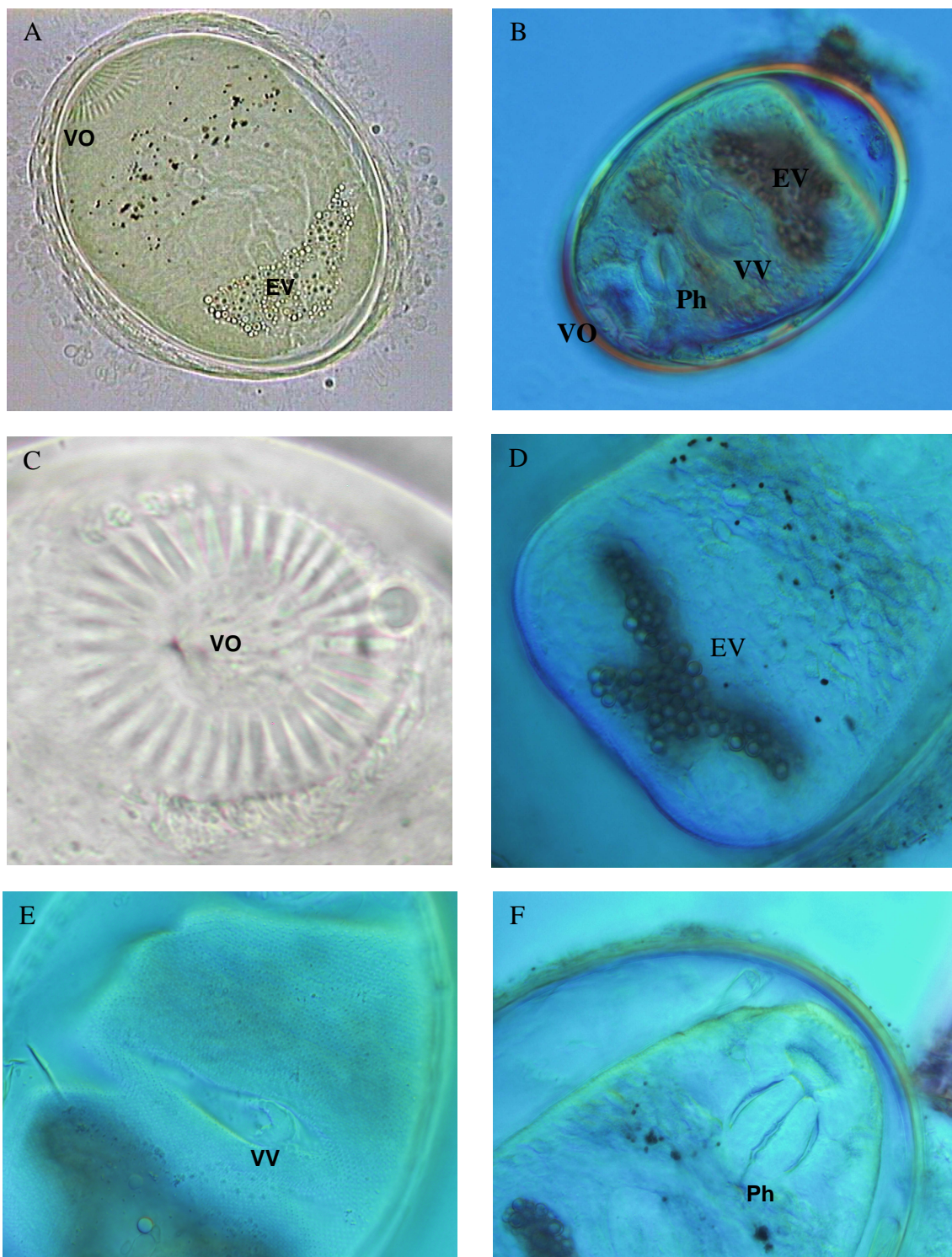


Fig. 44 - Caratteristiche anatomiche delle metacercarie incistate in *A. fasciatus*: (A, B) metacercarie con in evidenza la ventosa orale (VO), la ventosa ventrale (VV), la vescica escrettrice (EV) ed il faringe (Ph) (10×); (C, D, E, F) dettagli a maggiore ingrandimento (40×)

All'excistamento era possibile effettuare ulteriori valutazioni morfometriche del parassita. In aggiunta a quanto indicato per la metacercaria incistata si poteva infatti notare un'estesa protrusione muscolare dorsale al prefaringe, una proiezione conica della ventosa orale ed un'ampia banda ghiandolare subito posteriormente al faringe, come si evince dalla figura sottostante (Fig. 45).

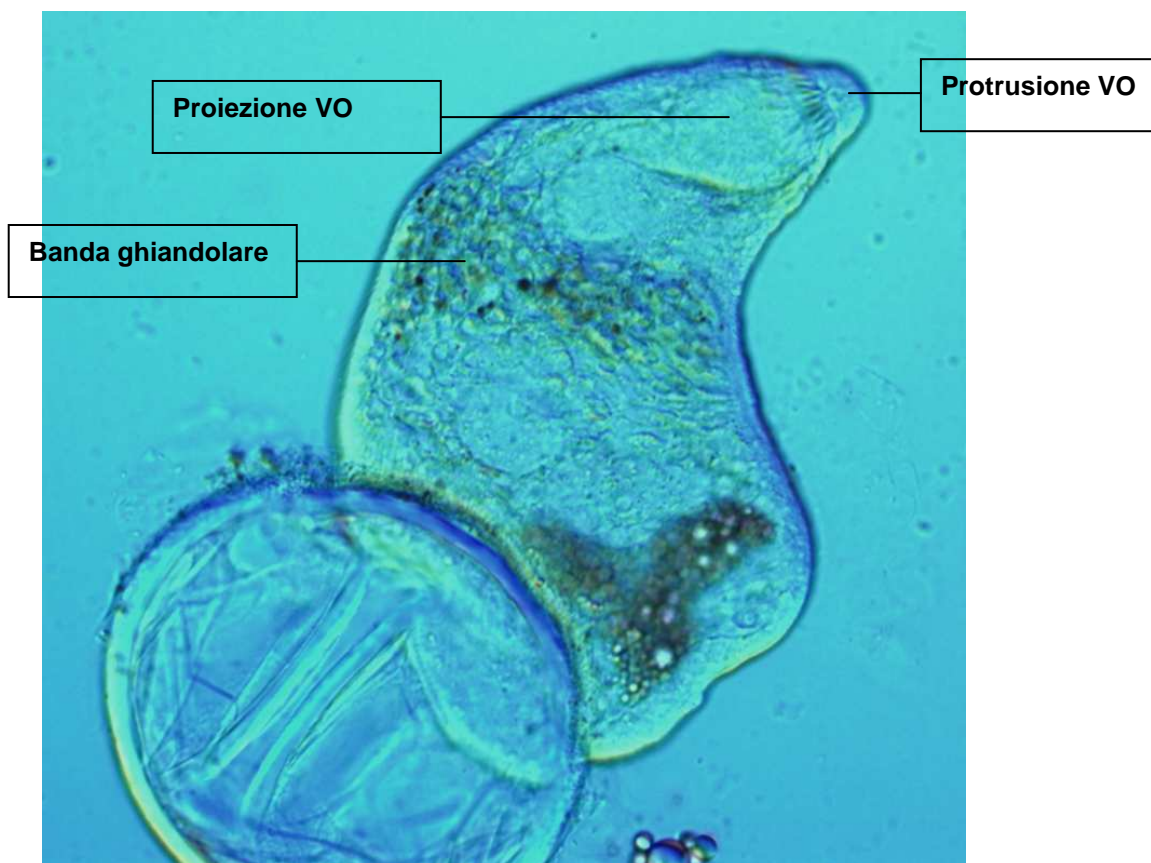


Fig. 45 – Metacercaria excistata con in evidenza alcune strutture caratteristiche del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*)

Il complesso delle caratteristiche osservate ha permesso di ascrivere l'appartenenza del parassita alla famiglia Heterophyidae ed in particolare al genere *Ascocotyle* (*Phagicola*), parassiti intestinali comuni in mammiferi ed uccelli ittiofagi che nel loro ciclo biologico riconoscono come ospiti intermedi organismi acquatici di ambienti d'acqua salmastra, sia invertebrati (molluschi gasteropodi) che pesci appartenenti a numerose specie, mugilidi e ciprinodontidi in particolare (Scholz, 1999).

Per raggiungere un'identificazione di specie corretta del parassita da noi isolato si è quindi reso necessario ottenerne gli adulti attraverso l'infestazione sperimentale di 4 anatroccoli. Gli animali venivano alimentati con 4 soggetti di *A. fasciatus* infestati e a partire dal 7° giorno post-infezione si è potuta rilevare la presenza di uova ascrivibili al trematode digeneo.

Gli animali venivano soppressi e sottoposti all'esame parassitologico che rilevava per tutti i soggetti la presenza di parecchie decine di parassiti nel lume intestinale. L'osservazione al microscopio ottico confermava trattarsi della specie in studio.

Nella tabella 13 vengono elencate le caratteristiche morfometriche principali di metacercarie e adulti del parassita.

CARATTERI METACERCARIA		
Cisti	Asse maggiore	173-250 (212,6)
	Asse minore	140-160 (154)
Parete	Spessore	3-4 (3,5)
Spine VO	Numero	29-33 (30)
CARATTERI ADULTO		
Spine VO	Numero	29-33 (30)
Corpo	Lunghezza	440-635 (565,7)
	Larghezza	290-470 (364,5)
Uova	Lunghezza	17-21 (19,1)
	Larghezza	11-12 (11,5)
VO	Lunghezza	60-85 (73,25)
	Larghezza	80-100 (87,25)
VV	Lunghezza	60-75 (69,0)
	Larghezza	75-85 (80)
Ph	Lunghezza	70-85 (75,5)
	Larghezza	60-80 (70,25)

Tab 13 – Rilevi morfometrici principali del parassita in esame espressi in valori max-min (media). Tutte le misure sono fornite in micrometri (µm).



Fig. 46 – Adulto di *Ascocotyle* (*Phagicola*) sp.

Nella tavola seguente vengono illustrate le caratteristiche del parassita rilevabili al SEM, in particolare la cuticola spinosa su tutto il corpo tranne che

nella porzione distale e le spine peristomiche della ventosa orale disposte su una sola fila, sono caratteristiche tipiche del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*).

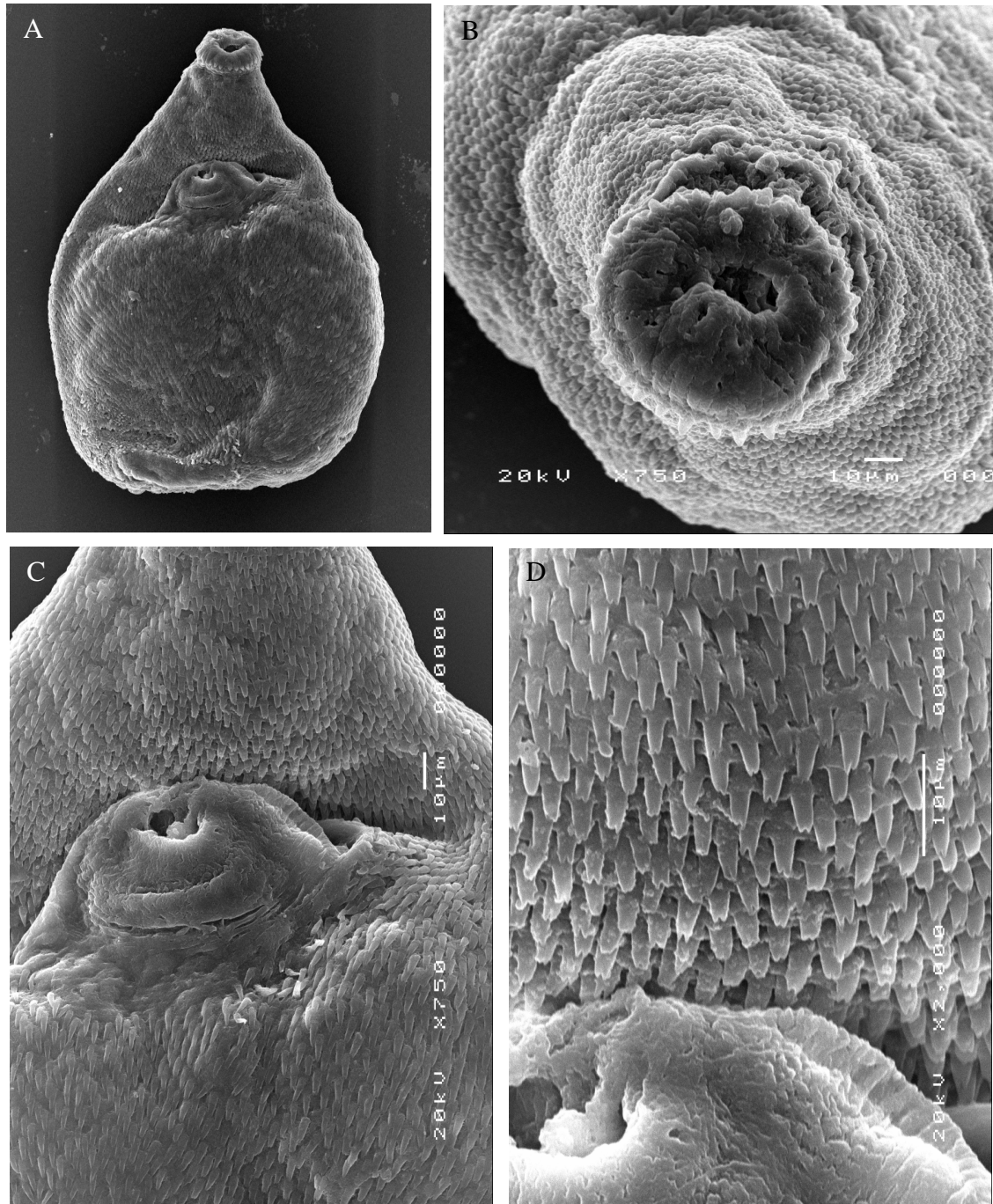


Fig. 47: Adulto del parassita in esame alla SEM: A) parassita *in toto*; B) dettaglio della ventosa orale con le spine peristomiche; C) dettaglio della ventosa ventrale; D) spine tegumentali

La valutazione delle caratteristiche morfometriche del parassita, confrontate con quelle di altri parassiti del genere *Phagicola* presenti in numerose descrizioni, per la verità di qualità assai disomogenea, ha permesso di ipotizzare che si possa trattare di una nuova specie, soprattutto in base al numero di spine orali particolarmente elevato per questo genere che al massimo ne riporta 20.

L'unica descrizione di una specie parassitaria simile a quella da noi studiata è stata rinvenuta in una pubblicazione di Travassos del 1931, in cui viene descritto in Brasile un parassita dall'intestino di un uccello marino, *Sula leucogastra*, che presenta tutte le caratteristiche del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*) ma che viene collocato curiosamente in un nuovo genere denominato *Lacerdaia* ed a cui viene assegnato il nome di *Lacerdaia lacerdai*. Di questo parassita poi si perdono le tracce nella bibliografia successiva, tranne che per una segnalazione di Yamaguti (1958) che riprende però le immagini e la descrizione del lavoro di Travassos. Il dato risulta ancora più strano poiché solo un anno prima Travassos pubblicava una revisione completa del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*) (Travassos, 1930). La descrizione di *L. lacerdai* presenta alcuni dati morfometrici di base che, confrontati coi nostri, differiscono in modo sostanziale per le dimensioni generali (*L. lacerdai* è nettamente più grande) e per la larghezza delle uova che nel nostro parassita sono sempre più ridotte rispetto ai 13-15 µm indicati da Travassos (1931). Il numero di spine peristomiche orali risulta invece sovrapponibile a quello da noi evidenziato nella specie in esame.

Né in questa revisione né nelle descrizioni di Neveu-Lemaire (1936), né tantomeno in quelle proposte da Burton (1958) vi è traccia di una specie avente ≥ 30 spine peristomiche disposte su una sola fila, come nel caso del parassita da noi descritto.

Altro carattere differenziale e da noi considerato determinante è la presenza, nel parassita reperito in *Aphanius fasciatus*, di una lunga proiezione conica posteriormente alla ventosa orale che in *L. lacerdai* manca e che Travassos stesso considera caratteristica del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*)

Dal punto di vista istopatologico le metacercarie si riscontravano nel peritoneo, nel grasso periviscerale, nel pancreas, nel parenchima epatico, nella milza, rene, muscolo scheletrico, branchie ed a carico della sierosa intestinale (Fig. 48). Le metacercarie si presentavano libere e/o incistate e, all'interno delle cisti, era possibile in alcuni casi rilevare nella larva una spessa cuticola eosinofila fittamente rivestita di spine, e ventose armate di spine robuste. Le forme incistate in particolare presentavano reazione infiammatoria di carattere cronico caratterizzata da un sottile strato fibroso e da cellule epitelioidi.

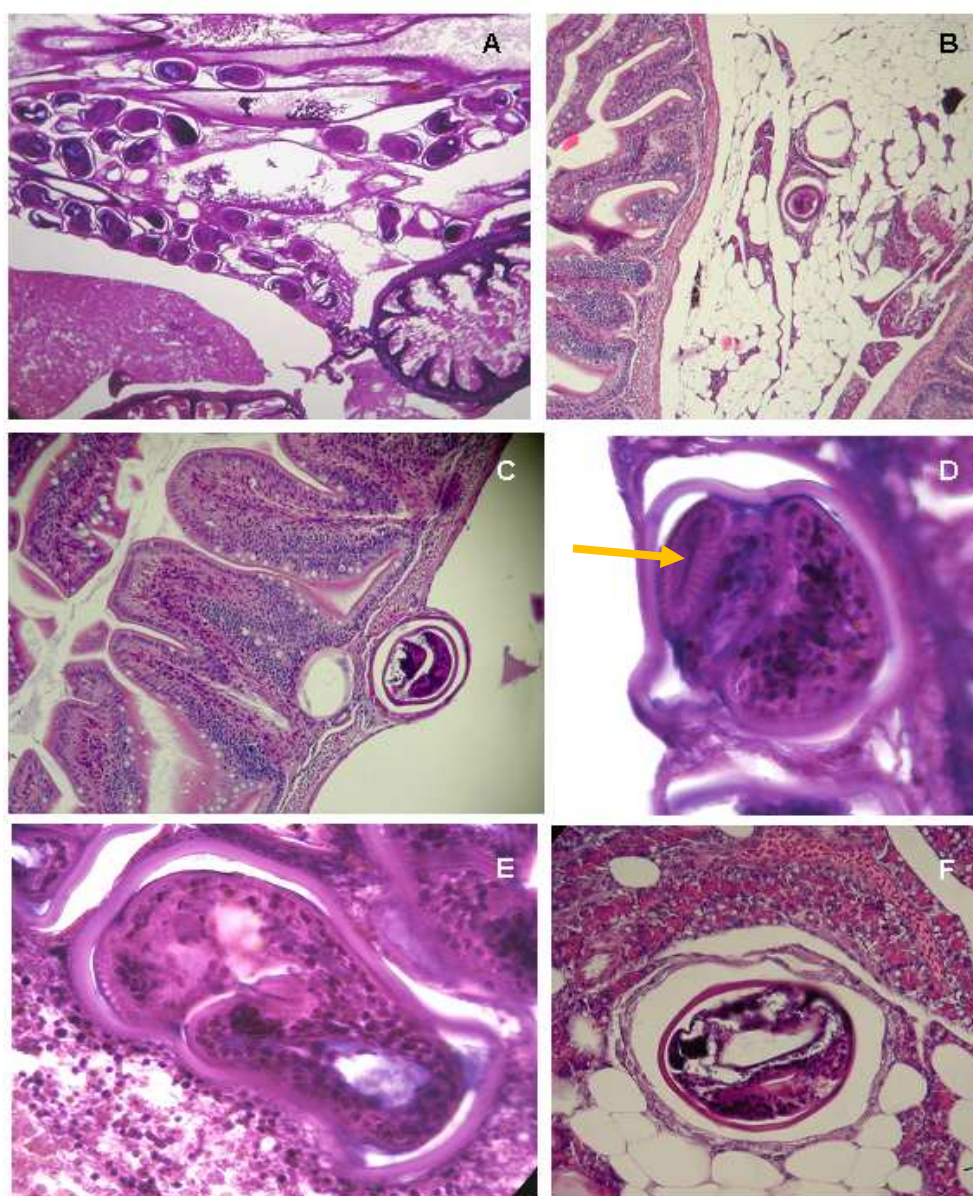


Fig. 48 – Sezioni istologiche di organi di *A. fasciatus* parassitati da metacercarie di *Ascocotyle* (*Phagicola*) sp.: A) peritoneo; B) pancreas; C) sottosierosa dell'intestino D) metacercaria con ventosa orale munita di spine peristomiche (freccia); E) milza; F) infestazione epatica con processi infiammatori attorno alla metacercaria incistata. HE

Il ciclo biologico dei digenei Heterophyidae prevede quale ospite definitivo un mammifero o un uccello ittiofago. Per quanto concerne i parassiti appartenenti al genere *Ascocotyle* (*Phagicola*), numerose sono le specie aviarie ritenute idonee come ospiti definitivi (Fig. 49). Alla luce del successo delle prove di infestazione sperimentale condotte su anatidi, nonché delle caratteristiche ambientali in cui i soggetti di *A. fasciatus* sono stati campionati, sembra possibile ipotizzare che anche nel caso della specie parassitaria descritta in questo studio l'ospite definitivo naturale sia rappresentato da un uccello ittiofago ancora da individuare.

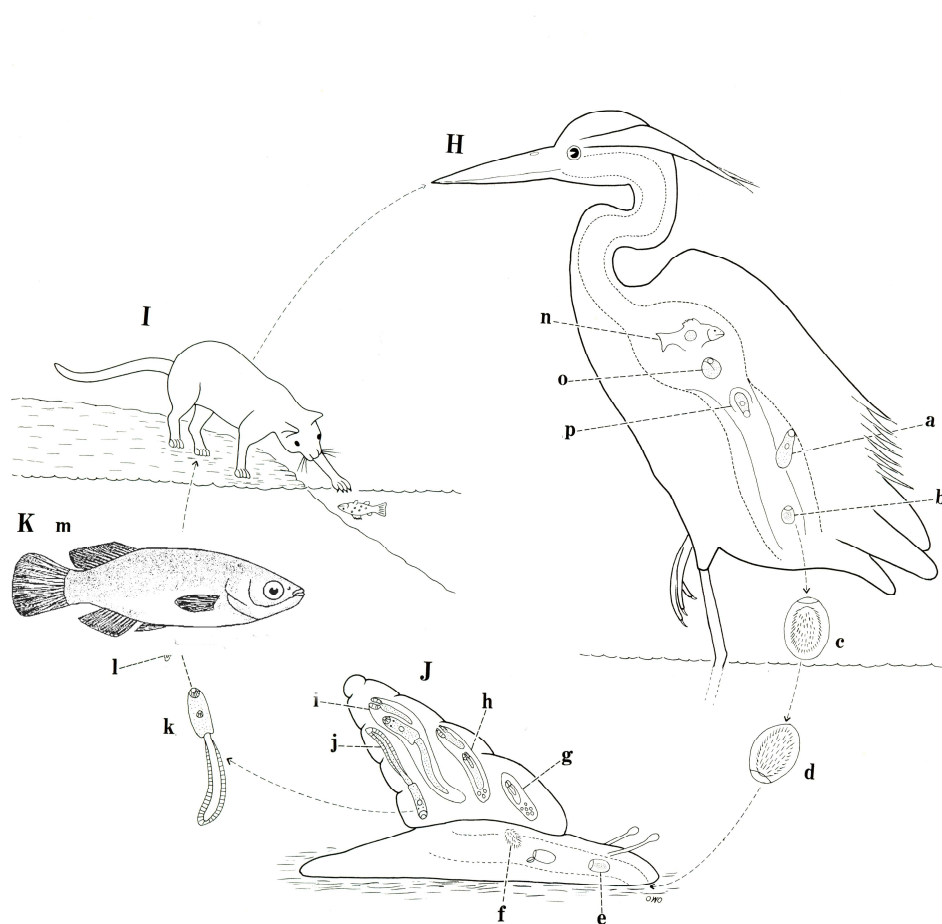


Fig. 49 – Ciclo biologico di trematodi digenei Heterophyidae che prevedono uccelli e/o mammiferi ittiofagi come ospiti definitivi

Resta di primaria importanza la messa a punto di un protocollo di identificazione molecolare, attualmente in corso d'opera, che permetta di rendere disponibili dati di tipo genetico su questa nuova specie.

La positività riscontrata anche nei soggetti di *A. fasciatus* prelevati presso le saline di Manfredonia suggerisce di ampliare le ricerche a tutte le aree lagunari nazionali dove risulta diffusa questa specie ittica, cercando di ricostruire il ciclo biologico naturale di questo parassita sia per quanto riguarda l'ospite definitivo che il primo ospite intermedio, probabilmente un mollusco gasteropode.

Per quanto riguarda la possibile trasmissione dell'infestazione all'uomo, sebbene questa rappresenti un'ipotesi ancora da comprovare o scartare, va evidenziato come *A. fasciatus* non sia una specie ittica di interesse alimentare. L'indagine andrà però estesa a quelle specie ittiche presenti negli stessi ambienti acquatici (es. mugilidi) che possono avere un interesse nell'alimentazione umana.

Va ricordato che casi umani di Phagicolosi sono stati registrati in periodi più o meno recenti in USA (Paperna e Overstreet, 1981) e in Brasile, dove in particolare le zoonosi hanno riguardato una paziente infestata da *Phagicola longa* (Chieffi *et al.*, 1990) e altri nove casi (Chieffi *et al.*, 1992) contratti in seguito al consumo di mugilidi crudi.

L'appartenenza del genere *Phagicola* alla famiglia Heterophyidae impone in generale una certa attenzione al reperimento della parassitosi in animali acquatici diffusi sul territorio nazionale.

La famiglia Heterophyidae comprende infatti ben 35 specie in grado di determinare patologia nell'uomo a livello intestinale (Chai *et al.*, 2005), pur rivestendo di solito un ruolo meno patogeno rispetto ai trematodi epatici di cui abbiamo discusso nel capitolo precedente. Alcune specie sono comunque in grado di determinare nell'uomo anche infestazioni fatali a livello di cuore, cervello e midollo spinale per disseminazione delle loro uova nel torrente circolatorio in seguito ad ulcerazione della mucosa intestinale (WHO, 1995).

Le specie più importanti da un punto di vista zoonosico sono *Metagonimus yokogawai*, assai diffuso in Estremo Oriente, Cina e Corea specialmente, ma segnalato nell'uomo anche in Europa (Spagna) e Siberia, e *Heterophyes heterophyes*, endemico in Egitto e Sudan.

Nella tabella seguente, presa da Chai e Lee (2002), sono indicate le specie di Heterophyidae che in Corea sono state imputate di infestazioni nell'uomo, rendendo l'idea di una problematica di Sanità Pubblica tutt'altro che trascurabile.

Family and species	Size of adult flukes (mm)	Year first human infection was reported
Heterophyidae		
<i>Metagonimus yokogawai</i> (Katsurada, 1912) Katsurada, 1912	1.0–2.0×0.4–0.6	1971
<i>Metagonimus takahashii</i> Suzuki, 1930	0.8–1.5×0.4–0.7	1988 (1993*)
<i>Metagonimus miyatai</i> Satio et al., 1997	0.9–1.3×0.4–0.6	1997 (1980*)
<i>Heterophyes nocens</i> Onji and Nishio, 1916	0.9–1.6×0.5–0.8	1981
<i>Heterophyopsis continua</i> (Onji and Nishio, 1916) Yamaguti, 1958	2.7–2.8×0.5–0.6	1984
<i>Pygidioopsis summa</i> Onji and Nishio, 1916	0.5–0.8×0.3–0.4	1981
<i>Stellantchasmus falcatus</i> Onji and Nishio, 1916	0.4–0.7×0.3–0.4	1984
<i>Centorcestus armatus</i> (Tanabe, 1922) Price, 1932	0.4–0.6×0.2–0.3	1988
<i>Stictodora fuscata</i> (Onji and Nishio, 1916) Yamaguti, 1958	0.9–1.0×0.3–0.4	1988
<i>Stictodora lari</i> Yamaguti, 1939	0.7–0.9×0.3–0.4	2001
Echinostomatidae		
<i>Echinostoma hortense</i> Asada, 1926	8.2–14.0×0.9–1.6	1983
<i>Echinostoma cinetorchis</i> Ando and Ozaki, 1923	8.6–15.0×2.0–2.4	1980
<i>Echinochasmus japonicus</i> Tanabe, 1926	0.5–1.0×0.3	1985
<i>Acanthoparyphium tyosenense</i> Yamaguti, 1939	1.8–2.0×0.4–0.5	2001
Neodiplostomidae		
<i>Neodiplostomum seoulense</i> (Seo et al., 1964) Hong and Shoop, 1995	0.8–1.2×0.4–0.5	1982
Plagiorchiidae		
<i>Plagiorchis muris</i> (Tanabe, 1922) Shul'ts and Skvortsov, 1931	2.9–3.0×0.8–1.0	1996
Gymnophallidae		
<i>Gymnophalloides seoi</i> Lee et al., 1993	0.4–0.5×0.2–0.3	1993

* Year the parasite was actually identified from human infections.

Numerose sono le difficoltà legate alla diagnosi di queste parassitosi in quanto le uova vengono molto spesso confuse con quelle di trematodi epatici quali *Opisthorchis/Clonorchis* ed i dati relativi alla diffusione delle diverse specie di Heterophyidae ed Opisthorchiidae sono sicuramente poco aderenti alla realtà: questo incide notevolmente sul livello di attenzione degli enti di Sanità Pubblica nelle aree endemiche e quindi sui programmi di profilassi e controllo necessari (Yu e Mott, 1994; Chai et al., 2005).

L'identificazione di specie a partire dalle uova rappresenta una priorità che solo le moderne tecniche molecolari sembrano poter risolvere nel prossimo futuro, non solo a fini epidemiologici ma anche per ragioni strettamente tassonomiche, alla luce della confusione che regna attualmente nella sistematica di questo importante gruppo.

Anche in questo caso la maggiore fonte d'infestazione per uomo ed animali è rappresentata dal consumo di pesce crudo o, nel caso dell'uomo, trattato in modo non sufficiente all'inattivazione delle metacercarie.

Le specie ittiche maggiormente responsabili delle infestazioni umane sono i mugilidi, pesci d'acqua salmastra che in molti paesi vengono utilizzati in sostituzione di pesci più pregiati per la preparazione di pietanze esotiche (*sushi* e *sashimi* soprattutto), mentre le altre specie ittiche prive di interesse nell'alimentazione umana (come ad esempio *A. fasciatus*) sono probabilmente all'origine delle infestazioni in mammiferi non umani ed uccelli ittiofagi. Proprio *A. fasciatus* è considerato ospite intermedio idoneo di *H. heterophyes* alla pari di *Mugil cephalus* e *Tilapia nilotica* (Yu e Mott, 1994), rappresentando quindi un ospite ittico importante nel mantenimento del ciclo biologico del parassita in ambienti acquatici marginali.

Dal punto di vista terapeutico, anche nel caso delle infestazioni da Heterophyidae il farmaco d'elezione è rappresentato dal praziquantel, che nel caso delle infestazioni umane da *Phagicola* registrati in Brasile, è stato utilizzato con efficacia al dosaggio di 75 mg/Kg/die per 3 giorni (Chieffi *et al.*, 1990).

6. CONTROLLO DELLE ZOONOSI PARASSITARIE DI ORIGINE ITTICA LEGATE AD AMBIENTI DULCIACQUICOLI

Le strategie di controllo delle zoonosi sostenute da parassiti di animali acquatici d'acqua dolce si compongono di diverse linee di intervento, che possono essere raggruppate in due categorie fondamentali: strategie di controllo a livello di popolazione e strategie di controllo individuali.

Le prime si basano su interventi di carattere ambientale, sanitario, normativo, culturale e sociale schematizzabili nei seguenti punti:

- prevenzione della contaminazione dei prodotti ittici da parte di stadi infettanti di parassiti zoonosici (lotta agli ospiti intermedi, individuazione e trattamento degli ospiti definitivi, interventi strutturali ed ambientali, canalizzazione e sanitizzazione dei reflui fognari, ecc.);
- educazione sanitaria rivolta soprattutto alle abitudini alimentari;
- misure di sorveglianza implementate da programmi HACCP;
- normative ed ordinanze di carattere locale, nazionale ed internazionale.

Il controllo individuale si basa invece fondamentalmente sull'applicazione di metodiche utili alla decontaminazione dei prodotti ittici mediante inattivazione degli stadi parassitari eventualmente presenti.

Per quanto concerne quest'ultimo punto, numerosi studi sono stati condotti allo scopo di definire la longevità e la resistenza dei parassiti ittici zoonosici nei prodotti ittici sottoposti a diverse metodiche di trattamento.

Sebbene in linea generale la cottura ed il congelamento rappresentino metodi di controllo idonei ad inattivare la maggior parte degli stadi parassitari presenti in prodotti ittici, possono esistere marcate differenze tra diversi gruppi tassonomici e/o tra diverse specie parassitarie.

Ad esempio, mentre gli stadi larvali di cestodi Pseudophyllidea e di nematodi Anisakidae mostrano una scarsa resistenza alle alte e basse temperature, le metacercarie di trematodi Opisthorchiidae ed Heterophyidae possono sopravvivere per periodi prolungati sotto condizioni di congelamento e cottura, come evidenziato nella tabella seguente.

Nella tabella 14 vengono schematizzate le metodiche utili a devitalizzare gli stadi larvali di parassiti zoonosici presenti in prodotti ittici dulciacquicoli in base alla bibliografia esistente.

Metodo	Parassita	Parametri	Periodo di sopravvivenza	Riferimento bibliografico
Congelamento	<i>Diphyllbothrium latum</i>	-6°C	7gg in lucci di 9 kg / 6gg in lucci di 2 kg / 3gg in lucci di 0,7 kg	Titova, 1955
		-18°C	4gg in lucci di 2 kg / 2gg in lucci di 0,5 kg	Titova, 1955
			24 ore	Acha e Szyfres (2003)
		-1 / -5°C	> 1 mese	Eguchi (1973)
		-6,5 / -8°C sol. salina	12 ore	Eguchi (1929)
		-16 / -17°C	5 gg	Senoo et al. (1925)
		-10°C	48 ore	Acha e Szyfres (2003)
			6 ore	Eguchi (1973)
	<i>Opisthorchis felineus</i>	-8 / -12°C	5-12 gg	WHO (1995)
		-20°C	- (efficace)	WHO (1995)
		-28°C	20 ore	Fattakhov (1989)
		-35°C	8 ore	Fattakhov (1989)
		-40°C	2 ore	Fattakhov (1989)
		-28°C	32 ore	Ministero della Salute, USSR (1990)
		-40°C	7 ore	Ministero della Salute, USSR (1990)
	"Metacercarie"	-10°C	>3 gg	Einawawl et al. (2000)
		-20°C	>2 gg	Einawawl et al. (2000)
	<i>Clonorchis sinensis</i>	-10°C	5 gg	WHO (1979)
		-12°C	>18 gg	Fan (1998)
		-20°C	>7 gg	Fan (1998)
	Heterophyidae	-10 / -20°C	30 ore	Hamed e Elias (1970)
Cottura	<i>D. latum</i>	56°C	5 minuti	Acha e Szyfres (2003)
	<i>O. viverrini</i>	70°C	30 minuti	Waikagul et al. (1974)
		80°C	5 minuti	Waikagul et al. (1974)
	<i>C. sinensis</i>	39-40°C	150 minuti	Shimazono e Hasui (1916)
		55°C	15 minuti	Takei e Fukase (1921)

		65°C	3 minuti	Shimazono e Hasui (1916)
	Heterophyidae	50°C	180 minuti	Hamed e Elias (1970)
		100°C	10 minuti	Hamed e Elias (1970)
Salagione	<i>O. felineus</i>	13,6% (fermentato)	24 ore	Kruatrachue <i>et al.</i> (1982)
	<i>O. viverrini</i>	20%	5 ore	Tesana <i>et al.</i> (1986)
	<i>C. sinensis</i>	5%	3-5 ore	Shimazono <i>et al.</i> (1916)
		10%	>7 gg	WHO (1979)
		30%	8 gg	Fan (1998)
Marinatura	<i>O. viverrini</i>	3% acido acetico+sale	Inefficace	Zviagina e Beer (1997)
		6% ac. acet.+sale	6 volte più efficace	Zviagina e Beer (1997)
		6% ac. acet. per 4 ore +sale	Efficace	Zviagina e Beer (1997)
	<i>C. sinensis</i>	Aceto	6 gg	Takei e Fukase (1921)
		Soluzione salina satura	> 2 gg	Takei e Fukase (1921)
Irradiazione	Metacercarie di Opisthorchiidae e Heterophyidae	0,15 KGy	Efficace	FAO/IAEA (1991)

Tabella 14 – Tecniche di devitalizzazione di stadi larvali di parassiti zoonosici presenti in prodotti ittici dulciacquicoli e relativa fonte bibliografica.

7. NORMATIVA INERENTE I PARASSITI ITTICI A CARATTERE ZONOSICO

Il problema delle infestazioni parassitarie dei pesci riveste, in sede di mercato, una duplice importanza per i riflessi che comporta sul valore merceologico del prodotto ittico e sulla salute del consumatore.

In un momento in cui si assiste ad un incremento del consumo di prodotti ittici a livello internazionale e nazionale, sia in risposta a problematiche sanitarie che hanno minato negli ultimi anni la “fiducia” del consumatore verso i prodotti carnei terrestri sia per gli indiscussi benefici derivanti dai prodotti della pesca sul sistema cardiocircolatorio e sul metabolismo in generale, la presenza d’infestazioni parassitarie, anche se non pericolose per l’uomo ma in grado di suscitare allarme o repulsione, può rappresentare un fattore limitante il consumo dei prodotti ittici e determinare ingenti perdite commerciali.

Per questo motivo, da parte degli organismi legislatori si è dato corso ad una serie di provvedimenti al fine di orientare l’azione del veterinario ispettore e delle aziende di produzione/commercializzazione verso la prevenzione delle possibili conseguenze derivanti dalla presenza di parassiti nei prodotti della pesca.

In quanto alimenti, questi ultimi sono stati presi in considerazione in passato dalla legge quadro sulle sostanze alimentari (legge n. 283 del 30-4-1962) che sanciva, all’articolo 5 (lettera d), il divieto di detenzione e di messa in circolazione, a qualsiasi titolo, di sostanze alimentari invase da parassiti.

Successivamente il decreto legislativo n. 531 del 30/12/1992, attuazione della direttiva 91/493/CE, ha stabilito le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione dei prodotti della pesca, ed al capitolo IV, paragrafo V dell’Allegato, ha dato disposizioni relative ai parassiti, stabilendo l’obbligo del “controllo visivo” del pescato anteriormente alla sua introduzione sul mercato, ai fini della ricerca e dell’asportazione di parassiti visibili, definendo “parassita visibile” un parassita che per dimensione, colore e struttura è chiaramente distinguibile dai tessuti del pesce, e “controllo visivo” l’esame non distruttivo dei prodotti della pesca, condotto senza l’ausilio di mezzi di ingrandimento ottico, in

condizioni di buona illuminazione per l'occhio umano e, se necessario, mediante la speratura. I pesci o le parti di pesce con presenza manifesta di parassiti non possono essere destinati al consumo umano.

A partire dal primo gennaio 2005, con l'attuazione del Reg. (CE) 178/02, e dal successivo primo gennaio 2006, con quella dei Regolamenti che costituiscono il cosiddetto *Pacchetto Igiene*, la gestione normativa si è spostata decisamente in senso orizzontale, ovvero su un piano generale ed uniforme su tutto il territorio dell'UE, individuando principi generali relativi alla sicurezza alimentare e prescindendo dalla tipologia di prodotto o dalla categoria merceologica.

In base alle disposizioni del *Pacchetto Igiene*, vanno sottoposti a congelamento ad una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa, per almeno 24 ore, i prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi ed i prodotti della pesca a base di aringhe ; sgombri, spratti, salmone selvatico dell'Atlantico e Pacifico se devono essere sottoposti ad un trattamento di affumicamento a freddo durante il quale la temperatura all'interno del prodotto non superi i 60°C, nonché i prodotti della pesca marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi. Gli operatori del settore alimentare non sono obbligati ai trattamenti qualora: a) i dati epidemiologici disponibili indichino che le zone di pesca di origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti; b) le autorità competenti lo autorizzino.

Gli operatori del settore alimentare devono assicurare che i prodotti della pesca siano sottoposti ad un controllo visivo alla ricerca d'endoparassiti visibili prima dell'immissione sul mercato. Devono essere condotti quindi controlli a campione intesi a verificare il rispetto della normativa comunitaria relativa ai parassiti. Gli operatori non devono immettere sul mercato per il consumo umano i prodotti della pesca manifestamente infestati da parassiti, per i quali deve esserne previsto lo smaltimento ai sensi del Reg.CE 1774/02.

I prodotti della pesca sono dichiarati non idonei al consumo umano se in seguito a controlli organolettici, chimici o microbiologici o a controlli relativi alla

presenza di parassiti essi si rivelano non conformi alla pertinente normativa comunitaria.

Va comunque specificato che tali disposizioni vengono riferite soprattutto a prodotti ittici derivanti dalla pesca in mare, dove il “rischio parassiti” si riferisce essenzialmente alla eventuale presenza di nematodi Anisakidae, mentre quelli provenienti dalle acque interne non vengono presi specificatamente in considerazione in quanto oggetto di pesca professionale di rilevanza locale e con ricadute commerciali spesso limitate.

Va comunque specificato che la plerocercosi sostenuta da *Diphyllbothrium latum* risulta una malattia denunciabile ai sensi del Regolamento di Polizia Veterinaria (D.P.R. n. 320 dell'8-2-1953, Suppl. G.U. n. 142 del 24-06-1954.). In dettaglio, nell'articolo 159, si prevede la distruzione dei pesci infestati da larve plerocercoidi di *D. latum* e l'applicazione di norme igieniche atte ad impedire la diffusione del parassita. In pratica, all'atto della diagnosi, pur venendo prevista l'applicazione di norme a carattere igienico, va applicata la distruzione della partita di pesci parassitata (Schiavo, 1997b).

Problemi di maggiore portata sono correlati ai controlli sanitari volti alla ricerca delle metacercarie di digenei Opisthorchiidae in specie ittiche dulciacquicole, in quanto si tratta di parassiti di piccolissime dimensioni e quindi “non visibili”. In seguito alla segnalazione di casi umani di Opistorchiasi sul lago Trasimeno e sul lago di Bolsena le Autorità Sanitarie Locali hanno quindi emanato Ordinanze specifiche che vietano la vendita ed il consumo (presso i ristoratori locali ed i privati) di specialità culinarie a base di pesci di lago crudi o poco cotti.

E' stata inoltre recentemente emanata (27/02/2008) a livello nazionale una nota informativa del Ministero della Salute avente come oggetto “Emergenza dell'opistorchiasi nell'Italia centrale” in cui si suggerisce di fornire a livello territoriale alcune misure precauzionali quali “*l'adeguata informazione del personale veterinario operante nel SSN, degli addetti alla ristorazione, alla commercializzazione del pesce d'acqua dolce e più in generale ai consumatori ed ai possessori quali cani e gatti; commercializzazione controllata con*

l'indicazione "da consumarsi previa cottura o congelamento a -20°C per una settimana; indagini conoscitive sul pescato proveniente da altri laghi, invasi e bacini lacustri dell'Italia settentrionale, centrale meridionale ed insulare, per monitorare la diffusione di questo patogeno nelle specie ittiche ivi presenti, con particolare riguardo a quelle della famiglia Cyprinidae."

Poiché la trasmissione delle parassitosi dal pesce all'uomo è sempre legata alla via alimentare, ed in particolare al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti, si può innanzitutto affermare che, oltre all'effettuazione di idonei esami ispettivi, l'educazione sanitaria applicata alle consuetudini alimentari riveste un ruolo molto importante nella prevenzione delle zoonosi parassitarie di origine ittica.

In senso generale va comunque tenuto presente che in Italia le abitudini alimentari della popolazione non contemplano il consumo di pesce crudo, se non limitatamente a prodotti tipici locali e ad usanze territoriali. Vanno però sempre presi in considerazione sia i rischi connessi alle abitudini alimentari di coloro che provengono da Paesi in cui i prodotti ittici vengono comunemente consumato crudi o poco cotti e che vivono ormai stabilmente in Italia, nonché la crescente diffusione sul territorio nazionale di ristoranti giapponesi, le cui preparazioni più tipiche sono rappresentate da *sushi* e *sashimi*, entrambe a base di pesce crudo, e di preparazioni culinarie a rischio in ristoranti turistici di zone lacustri dell'Italia centro-settentrionale.

Alla base di una buona riuscita degli interventi di controllo e profilassi nei confronti delle zoonosi parassitarie di origine ittica dovrà essere sempre presente un'ampia conoscenza di tutti gli agenti parassitari di possibile riscontro negli animali acquatici oggetto di consumo alimentare e potenzialmente patogeni per l'uomo.

Ne è esempio il recente riscontro, riportato in questa tesi di dottorato, di un parassita Heterophyidae non ancora descritto né sul territorio nazionale né su quello estero e la cui importanza sanitaria per gli animali acquatici e per l'uomo dovrà essere in futuro studiata e definita.

Anche se molte parassitosi ittiche a carattere zoonosico non risultano segnalate in Italia, bisogna tenere presente la facilità con cui la commercializzazione di prodotti ittici ai fini alimentari e l'importazione di materiale ittico vivo ai fini del ripopolamento e dell'allevamento possano rappresentare vie d'entrata di patogeni nuovi di difficile individuazione nel corso delle attività routinarie di controllo sanitario dei prodotti ittici.

Va infine posto in evidenza come a tutt'oggi in Italia la presenza di elminti zoonosici non sia mai stata descritta in specie ittiche dulciacquicole d'allevamento, indicando come le caratteristiche strutturali e gestionali della moderna acquacoltura permettano di prevenire la realizzazione del ciclo biologico di questi parassiti ed offrire quindi una maggiore garanzia igienico-sanitaria in relazione alle zoonosi parassitarie di origine ittica.

8. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La discussione e le considerazioni relative ai risultati delle attività di ricerca esposte nella presente tesi sono stati riportati nei rispettivi capitoli. Venogno qui di seguito sintetizzati i principali obiettivi raggiunti:

- aggiornamento dei dati di prevalenza della plerocercosi ittica da *Diphyllbothrium latum* nelle popolazioni ittiche di laghi dell'Italia settentrionale, con particolare riferimento al Lago di Como;
- messa a punto di tecniche diagnostiche utili al rilevamento e all'identificazione di larve plerocercoidi di cestodi Diphyllbothriidae e Triaenophoridae in prodotti ittici d'acqua dolce;
- definizione del ciclo biologico e della diffusione di *Triaenophorus crassus* in animali acquatici ambienti lacustri dell'Italia settentrionale;
- individuazione degli ospiti intermedi e definitivi di *Opisthorchis felineus* in Italia centrale e messa a punto di tecniche parassitologiche utili al rilevamento ed all'identificazione dei diversi stadi parassitari;
- descrizione di parassiti Heterophyidae del genere *Phagicola* di nuovo riscontro sul territorio nazionale;

In linea generale le attività di ricerca esposte nella presente tesi di dottorato hanno permesso di approfondire le conoscenze relative alle zoonosi di origine ittica sostenute da elminti parassiti di pesci d'acqua dolce, argomento di importanza emergente in Italia ma non ancora annoverato fra le problematiche di sanità pubblica di rilevanza nazionale.

Le attività di ricerca condotte nell'ambito della presente tesi di dottorato sono state oggetto delle pubblicazioni scientifiche e delle comunicazioni a convegno qui di seguito elencate:

- ✓ Gustinelli A., Pircher A., Fioravanti M.L., Marcer F., Invernizzi S., Trentini M. (2005). Plerocercosi da *Triaenophorus crassus* (Cestoda,

- Pseudophyllidea) in coregoni (*Coregonus* spp.): primi riscontri in Italia. *Atti del XII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica* (S.I.P.I.), Cesenatico (FC), 29-30 settembre - 1 ottobre 2005, 50.
- ✓ Vaiani R., Terramocci R., Crotti D., Gustinelli A., Invernizzi S., Fioravanti M.L., Pampiglione S. (2006). Diphyllbothriasis in Como Lake, northern Italy: an update. *Parassitologia*, 48 (Suppl. 1-2): 297
 - ✓ Gustinelli A., Pircher A., Stifter E., Fioravanti M.L. (2006). Plerocercosis by *Triaenophorus crassus* (Cestoda, Pseudophyllidea) in whitefish (*Coregonus* spp.) in Italy. *Parassitologia*, 48 (Suppl. 1-2): 287.
 - ✓ Gustinelli A., Invernizzi S., Romanò C., Fioravanti M.L. (2006). Plerocercosi da *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea) nel lago di Como: aggiornamenti epidemiologici. *Atti del XIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica* (S.I.P.I.), Abano Terme (PD), 26-28 ottobre 2006, 21.
 - ✓ Gustinelli A., Agnetti F., Latini M., Ghittino C., Lovaglio G., Natali M., Fioravanti M.L. (2006). Nuovi dati sulla Opisthorchiasi in Italia. *Atti del XIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica* (S.I.P.I.), Abano Terme (PD), 26-28 ottobre 2006, 24.,
 - ✓ Gustinelli A., Grund H., Pircher A., Fioravanti M.L., Stifter E. (2006). Plerocercosi da *Triaenophorus crassus* (Cestoda, Pseudophyllidea) in Italia. *Ittiopatologia*, 3: 143-154.
 - ✓ Gustinelli A., Grund H., Pircher A., Stifter E., Quaglio F., Fioravanti M.L. (2007). Rischi sanitari legati al ripopolamento delle acque interne: triaenoforosi e cistidicolosi. *Atti del XIV Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica* (S.I.P.I.), Castiglione della Pescaia, 15-16 Novembre 2007, 16.
 - ✓ Kuchta R., Vlčková R., Poddubnaya L.G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. (2007). Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea): evidence from morphometric analysis of scolex hooks. *Folia Parasitologica*, 57 (1): 34-42

- ✓ Gustinelli A., Invernizzi S., Kuchta R., Fioravanti M.L. (2007) Fish-borne parasitic zoonoses: recrudescence of diphylobothriasis in Como Lake, Northern Italy. *Parassitologia*, 49 Suppl.2: 202.
- ✓ Gustinelli A., Grund H, Pircher A., Quaglio F., Fioravanti M.L. (2007). Plerocercosis by *Triaenophorus* spp. (Cestoda: Pseudophyllidea) in Northern Italy. *Book abstracts of 13th International Conference of the European Association of Fish Pathologists (EAFP), Grado, 17-22 september 2007,*
- ✓ Agnetti F., Gustinelli A., Cari R., Marchetti D., Crotti D., Fioravanti M.L., Ghittino C. (2007). Occurrence of *Opisthorchis* spp. metacercariae in cyprinids from Trasimeno Lake, Central Italy. *Book abstracts of 13th International Conference of the European Association of Fish Pathologists (EAFP), Grado, 17-22 september 2007,* 219.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Abdussalam M., Käferstein F.K., Mott K.E. (1995). Food safety measures for the control of food borne trematode infections. *Food Control*, **6** (2): 71–79.
- ✓ Acha P. N., Szyfres B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Vol. 3. *Pan American Health Organisation*, 135-139.
- ✓ Aisa E. (1970). Infestioni da *Triaenophorus lucii* Müller (= *T. nodulosus* Pallas) in una popolazione di *Tinca tinca* L. di un lago laminare (Trasimeno). *Atti Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, **24**: 569-572.
- ✓ Andersen K., Ching H.L., Vik R. (1987): A review of freshwater species of *Diphyllbothrium* with redescrptions and the distribution of *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825) from North America. *Canadian Journal of Zoology*, **65**: 2216-2228.
- ✓ Andersen K.I., Gibson D.I. (1989). A key to three species of larval *Diphyllbothrium* Cobbold, 1858 (Cestoda pseudophyllidea) occurring in European and North America freshwater fish. *Systematic Parasitology*, **13**: 3-9.
- ✓ AOAC. (1995). Parasites in Fish Muscle: Candling Procedure. Sec. 35.1.38, Method 985.12. In Official Methods of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p. 22-23. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- ✓ Bauer O.N., Solomatova V.P. (1984). The cestode *Triaenophorus crassus* (Pallas) (Pseudophyllidea: Triaenophoridae) as a pathogen of cage-reared salmonids. *Journal of Fish Diseases*, **7**: 501-504.
- ✓ Belding. D. L. (1965). Textbook of Parasitology. Hardcover, 696-700.
- ✓ Bernieri F., Crotti D., Galli D., Raglio A. (2002). Manuale illustrato di diagnostica parassitologica. Bio-development eds.
- ✓ Boch J., Supperer R. (1980). Parassitologia Clinica Veterinaria. Ed. Essegivi, 361-363.

- ✓ Bonini, P., Montorfani S., Peduzzi R., Renon P. (1998). Situazione della plerocercosi nei laghi insubrici italo-svizzeri. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, **4**: 65-71.
- ✓ Borroni I., Grimaldi E. (1973). Frequenza dell'infestione muscolare da larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium latum* (Cestoda Pseudophyllidea) nel pesce persico (*Perca fluviatilis*) dei laghi italiani (anni 1968-1970). *Rivista di Parassitologia*, **34** (1): 45-54.
- ✓ Borroni I., Grimaldi E. (1974). Ecologia dell'infestione da larve plerocercoidi di *Diphyllbothrium latum* (Cestoda Pseudophyllidea) a carico delle specie ittiche del lago Maggiore. *Rivista di Parassitologia*, **35** (4): 129-144.
- ✓ Botti L. (1955). Su un caso di adenocarcinomatosi epatica in cane associata ad infestione massiva da *Opisthorchis felinus* Rivolta 1884. *Annali dell'Università di Pisa*, 241-256.
- ✓ Brabec J., Kuchta R., Scholz T. (2006). Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Cestoda): Circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1535-1541.
- ✓ Bray R.A., Jones A., Andersen K.I. (1994). Order Pseudophyllidea. In: Khalil L.F., Jones A., Bray R.A. Key to the Cestode parasites of Vertebrates. Ed. Cab International, Wallingford, UK, **10**: 236-246.
- ✓ Bray R.A., Jones A., Hoberg E.P. (1999). Observation on the phylogeny of the cestode order Pseudophyllidea Carus, 1863. *Systematic Parasitology*, **42**: 13-20.
- ✓ Burton P.R. (1958). A review of the taxonomy of the trematode genera *Ascocotyle* (Looss) and *Phagicola* (faust) of the family Heterophyidae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **25**: 117-122.
- ✓ Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M. e Shostak A.W. (1997): Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, **83**: 575-583.

- ✓ Butt A.A., Aldridge K.E., Sanders C.V. (2004). Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. *The Lancet Infectious Diseases*, **4** (5): 294-300.
- ✓ Bylund G., Bang B., Wikgren K. (1977). Tests with a new compound (Praziquantel) against *Diphylobothrium latum*. *Journal of Helminthology* **51**: 115 –119
- ✓ Cabello F.C. (2007). Salmon aquaculture and transmission of the fish tapeworm. *Emerging Infectious Diseases*, **13** (1): 169-171.
- ✓ Carollo A. (1974). Indagini limnologiche sui laghi di Bolsena, Bracciano, Vico e Trasimeno. *Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque Roma*.
- ✓ Chai J. Y., Murrel K. D., Lymbery A. J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *International Journal for Parasitology*, **35**:1233-1254.
- ✓ Chai J.Y. Lee S.H. (2002). Foodborne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. *Parasitology International*, **51**: 129-154.
- ✓ Chieffi P.P., Gorla M.C., Torres D.M., Dias R.M., Mangini A.C., Monteiro A.V., Woiciechowski E. (1992). Human infection by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **95** (5): 346-348.
- ✓ Chieffi P.P., Leite O.H., Dias R.M., Torres D.M., Mangini A.C. (1990). Human parasitism by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in Cananèia, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **32** (4): 285-288.
- ✓ Codex Alimentarius (1976), 1 - Volume 9.
- ✓ Crotti D. (2007). *Opisthorchis felineus* in deiezioni fecali della popolazione felina all'Isola Maggiore del Trasimeno (PG). *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica*, **11** (1): 20-23.
- ✓ Crotti D., Fioravanti M.L., Gustinelli A., Florio D., Pampiglione S. (2004). Two cases of human Opisthorchiasis in Italy. *Parassitologia*, **46** (suppl. 1): 145.

- ✓ Das B., Tandon V., Saha N. (2004) Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in glucose metabolism of the cestode, *Raillietina echinobothrida*. *Parasitology International*, **53**: 345– 350
- ✓ Dawes B. (1956). The Trematoda. Cambridge at the university press. Pp 395-397.
- ✓ Dick T.A., Chambers C., Isinguzo I. (2006). Cestoidea (Phylum Platyhelminthes). In: Woo P.T.K. (ed) *Fish Diseases and Disorders Vol. 1: Protozoan and Metazoan Infections. 2nd Edition. CAB International Ed., Wallingford, Oxfordshire, UK*: 391-416.
- ✓ Ditrich O., Giboda M., Scholz T., Beer S.A. (1992). Comparative morphology of eggs of the Haplorchinae (Trematoda: Heterophyidae) and some other medically important heterophyid and opisthorchiid flukes. *Folia Parasitologica*, **32**:123-132.
- ✓ Ditrich O., Giboda M., Štěrbá J. (1990). Species determination of eggs of opisthorchiid and heterophyid flukes using scanning electron microscopy. *Angewandte Parasitologie*, **31**: 3-9.
- ✓ Dörücü M. (1999): Seasonal variation of pseudophyllidean cestode, *Diphyllbothrium* spp. infection in *Cylops strenuus abyssorum* (Copepoda) in Loch Lomond. *Turkish Journal of Zoology* **23**: 85-91.
- ✓ Dupuoy-Camet J., Peduzzi R. (2004). Current situation of human Diphyllbothriasis in Europe. *Biologi Italiani*, **9**: 15-19.
- ✓ Eguchi S. (1973). *Diphyllbothrium latum* (Linnaeus, 1758). In: Progress of Medical Parasitology in Japan, vol 5, ed. Meguro Parasitological Museum, Tokyo, 129-144.
- ✓ Elnawawi F.A., Tawfik M.A.A., Shaapan R.M. (2000). Some methods of inactivation or killing of encysted metacercariae in *Tilapia* muscle. *Egyptian Journal of Veterinary Science*, 34.
- ✓ Essex H.E., Magath T.B. (1931). A comparison of the viability of ova of the broad fish tapeworm, *Diphyllbothrium latum*, from man and dogs: its bearing on the spread of infestation of the parasite. *American Journal of Hygiene*, **14**: 698-704.

- ✓ Fan P.C. (1998). Viability of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in frozen or salted freshwater fish. *International Journal for Parasitology*, **28**: 603-605.
- ✓ FAO/IAEA (1992). Final FAO/IAEA research coordination meeting on the use o irradiation to control infectivity of foodborne parasites. *Food Irradiation Newsletter*, **16** (1): 5-14.
- ✓ Fattakhov, R.G. 1989. [Low-temperature regimes for the decontamination of fish of the larvae *Opisthorchis*] *Med. Parazitol (Mosk)* 5, 63-64.
- ✓ Fioravanti M.L., Restani R. (2003). Zoonosi parassitarie di origine ittica". in: *Parassitologia Urbana*, a cura di Puccini V. Tarsitano E. Il Sole 24 ore ed Agricole, Bologna.
- ✓ Fried B., Graczyk T.K., Tamang L. (2004). Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitology Research*, **93** (2): 159-170.
- ✓ Hamed M.G.E., Elias A.N. (1970). Effect of food processing methods upon survival of the trematode *Heterophyes* sp. in flesh of mullet caught from brackish Egyptian waters. *Journal of Food Science*, **35**: 386.
- ✓ Hoffman G.L. (1999). *Parasites of North American freshwater fishes*. Cornell University Press, Ithaca e London. Pp 217-253.
- ✓ Jongsuksuntigul P., Imsomboon T. (2003). *Opisthorchiasis* control in Thailand. *Acta Tropica*, **88** (3): 229-232.
- ✓ Kaewkes S. (2003). Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Tropica*, **88**: 177-186.
- ✓ Kaiser J., Utzinger J. (2005). Emerging Foodborne Trematodiasis. *Emerging Infectious Disease*, **11** (10):1507-1514.
- ✓ Kakei S., Fukase K. (1922). The effect of the habit of eating freshwater fish and the disposal of drinking water on the infection of *Clonorchis sinensis* in the endemic area of clonorchiasi. *Okayama Igakkai Zasshi*, 385: 98.

- ✓ King S., Scholz T. (2001). Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. *The Korean Journal of Parasitology*, **39** (3):209-221.
- ✓ Kirkpatrick C.E. Knochenhauer A.W. Jacobson S.I. (1987). Use of praziquantel for treatment of *Diphyllbothrium* sp infection in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **190** (5): 557-558.
- ✓ Krauss H., Weber A., Apple M., Enders B., Isenberg H. D., Gerd Schiefer H., Slenczka W., von Graevenitz A., Zahner H. (2003). Zoonoses. ASM Press, 322-323.
- ✓ Kruatrachue, M., Y.P. Chitramvong, E.S. Upatham, S. Vichari e V. Viyanant 1982. Effects of physico-chemical factors on the infection of hamsters by metacercariae of *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 13, 614-617.
- ✓ Kuchta R., Vlčková R., Poddubnaya L.G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. (2007). Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea): evidence from morphometric analysis of scolex hooks. *Folia Parasitologica*, **57** (1): 34-42.
- ✓ Kumar V. (1999). Trematode infections and diseases of man and animals. Kluwer Academic Publishers: 258-270.
- ✓ Kuperman B.I. (1968). New species of the genus *Triaenophorus* Rud. (Pseudophyllidea). *Parazitologiya*, **2**: 495-501.
- ✓ Kuperman B.I. (1973). Tapeworms of the genus *Triaenophorus*, parasites of fish. *Ed. Amerind Publishing, Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 1981*: 1-222.
- ✓ Lancioni T., Gaino E. (2006). The invasive zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Trasimeno (Central Italy): Distribution and reproduction. *Italian Journal of Zoology*, **73** (4): 335-346.
- ✓ Lawler G.H. (1970). Parasites of coregonid fishes. In: Linsey C.C. and Woods C.S. (eds) *Biology of coregonid fishes*. University of Manitoba Press, Winnipeg, Manitoba, 279-310.

- ✓ M.P.O. (1983). Norme de qualité pour des produits frais et congelés du poisson de fond de l'Atlantique. MPO-1983-1. Dir. de l'inspection et de la technologie, Ottawa, Canada.
- ✓ Macpherson C.N.L. (2005). Human behaviour and epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **35** (11-12): 1319-1331.
- ✓ Mairiang E., Mairiang P. (2003). Clinical manifestation of opisthorchiasis and treatment. *Acta Tropica*, **88** (3):221-227.
- ✓ Mariaux J. (1998). A molecular phylogeny of the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, **84**: 114–124.
- ✓ Meyer M.C. (1966). Evaluation of criteria for the recognition of *Diphyllbothrium* species. *Transactions of the American Microscopical Society*, **85** (1): 89-99.
- ✓ Miller R. (1945). Studies on cestodes of the genus *Triaenophorus* from fish of Leader Slave Lake, Alberta. IV. The life of *Triaenophorus crassus* Forel in the second intermediate host. *Canadian Journal Research*, **23**: 105-115.
- ✓ Miller R. (1952). A review of the *Triaenophorus* problem in Canadian lakes. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*, **95**: 1-42.
- ✓ Miyazaki I. (1991). Helmintic zoonoses. International Medical Foundation of Japan, Tokyo, 201-207.
- ✓ Morishita K., Komiya Y., Matsubayashi H. (1973). Progress of Medical Parasitology in Japan. Ed. Meguro Parasitological Museum, Tokyo, Japan. **5**: 129-144.
- ✓ Nawa Y., Hatz C., Blum J. (2005). Sushi Delights and Parasites: The Risk of Fishborne and Foodborne Parasitic Zoonoses in Asia. *Travel Medicine*, **41** (1): 1297-1303.
- ✓ Neveu-Lemaire M. (1936). Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. Ed. Vigot Frères, Paris, France, 386-396.

- ✓ Nicoulaud J., Yéra H., Dupouy-Camet J. 2005: Prévalence de l'infestation par *Diphyllbothrium latum*, L., 1758 chez les perches (*Perca fluviatilis*) du Lac Léman. *Parasite*, **12**: 362-364.
- ✓ Nyberg W. (1963). *Diphyllbothrium latum* and human nutrition, with particular reference to vitamin B deficiency. *Proceeding of the Nutrition Society*, **22**: 8.
- ✓ Oliveira P., Pires M.A., Rodrigues P., Ginja M., Pires M.J., Pires I., Cardoso L., Antunes L., Rodrigues M. (2005). *Opisthorchis felinus* in cat: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **57** (4): 556-558.
- ✓ Orlandi P.A., Chu D.M.T., Bier J.W., Jackson G.J. (2002). Parasites and the food supply. *Food Technology*, **56** (4): 72-80.
- ✓ Paperna I., Overstreet R.M. (1981). Parasites and diseases of mullet (Mugilidae). In: OWEN O.H. ed. *Aquaculture of grey mullet*. London Cambridge University Press, 411-493.
- ✓ Parona C. (1894). L'elmintologia italiana: da' suoi primi tempi all'anno 1890. Atti della Regia Università di Genova. Volume 13: 734.
- ✓ Pasternak A.F., Pulkkinen K., Mikheev V.N., Hassu T. e Valtonen E.T. (1999). Factors affecting abundance of *Triaenophorus* infection in *Cyclops strenuus*, and parasite-induced changes in host fitness. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1793-1801.
- ✓ Peduzzi R., Boucher-Rodoni R. (2001). Resurgence of human bothriocephalosis (*Diphyllbothrium latum*) in the subalpine lake region. *Journal of Limnology*, **60** (1): 41-44.
- ✓ Perera D.R., Western K.A., Myron G., Schultz (1970). Niclosamide, treatment of Cestodiasis. Clinical Trials in the United States *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, **19** (4): 610-612.
- ✓ Perroncito E. (1901). I parassiti dell'uomo e degli animali utili e le più comuni malattie da essi prodotte. Biblioteca Medica Italiana, Casa Editrice Vallardi, Milano. Pp 632.

- ✓ Phyllis G., Fraser G. (1960). The Occurrence of *Diphyllbothrium* in Trout, with Special Reference to an Outbreak in the West of England. *Journal of Helminthology*, **34** (1/2): 59-72.
- ✓ Preuksaraj S. (1984). Public health aspects of opisthorchiasis in Thailand. *Arzneimittelforschung*, **34**: 1119-1120.
- ✓ Pulkkinen K., Valtonen E.T. (1999). Accumulation of plerocercoids of *Triaenophorus crassus* in the second intermediate host *Coregonus lavaretus* and their effect on growth of the host. *Journal of Fish Biology*, **55**: 115-126.
- ✓ Quinn P. J., Donnelly W. J. C., Carter M. E., Markey B. K. J., Torgerson P. R., Breathnach R. M. S. (1997). Microbial and parasitic diseases of the dog and cat. Saunders. Pp 94-95.
- ✓ Rahkonen R., Aalto J., Koski P., Sarka J., Juntunen K. (1996). Cestode larvae *Diphyllbothrium dendriticum* as a cause of heart leading mortality in hatchery reared sea trout and brown trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, **25**: 15-22.
- ✓ Regolamento di Polizia Veterinaria emanate con D.P.R. 8/2/1954 n- 320.
- ✓ Rim H.J., Farag H.S., Sommani S., Cross J.H. (1994). Foodborne Trematodes; ignored or emerging. *Parasitology Today*, **10**: 207-209.
- ✓ Rivolta S. (1884). Sopra una specie di distoma nel gatto e nel cane. *Giornale di Anatomia Fisiologia e Patologia degli Animali*, **1**: 20-28.
- ✓ Rodger H.D. (1991): *Diphyllbothrium* sp. infection in freshwater reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **95**: 7-14.
- ✓ Rondanelli E.G., Fabbi M., Marone P. (2005). Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari. *Selecta Medica*, 826-827.
- ✓ Rosen R., Dick T.A. (1983). Development and infectivity of the proceroid of *Triaenophorus crassus* Forel and mortality of the first intermediate host. *Canadian Journal of Zoology*, **61**: 2120-2128.
- ✓ Santos F.L.N. e de Fario L.B. (2005). The first confirmed case of *Diphyllbothrium latum* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**: 685-686.

- ✓ Schiavo A. (1997) Recrudescenza della plerocercosi in rapporto anche alle nuove abitudini alimentari. *// Pesce*, **14** (1): 90.
- ✓ Scholz T. (1999). Taxonomic study of *Ascocotyle (Phagicola) lunga* Ransom, 1920 (Digenea Heterophyidae) and related taxa. *Systematic Parasitology*, **43**: 147-158.
- ✓ Scholz T., Paggi L., Di Cave D., Orecchia P. (1992). On some cestodes parasitizing freshwater fish in Italy. *Parassitologia*, **34**: 167-178.
- ✓ Schuster R., Heidrich R., Pauly A., Knokler K. (2007). Liver flukes in dogs and treatment with Praziquantel. *Veterinary Parasitology*, **150** (4): 362-365.
- ✓ Shimazono J., Hasui N. (1916). Biological study on *Clonorchis sinensis* (first report). *Okayama Igakkai Zasshi*, **16** (7): 600-722.
- ✓ Shostak A.W. (1986). Sources of variability in life-history characteristics of the annual phase of *Triaenophorus crassus* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Ph.D. Thesis University of Manitoba, October 1986, pp* 324.
- ✓ Shostak A.W., Dick T.A. (1989). Variability in timing of egg hatch of *Triaenophorus crassus* as a mechanism increasing temporal dispersion of coracidia. *Canadian Journal of Zoology*, **67**: 1462-1470.
- ✓ Sithithaworn P., Haswell-Elkins M. (2003). Epidemiology of *Opisthorchis viverrini*. *Acta Tropica*, **88** (3):187-194.
- ✓ Sithithaworn P., Pipitgool V., Srisawangwong T., Elkins D. B., Haswell-Elkins M. (1997). Seasonal variation of *Opisthorchis viverrini* infection in cyprinoid fish in north-east Thailand: implications for parasite control and food safety. *Bulletin of the World Health Organization*, **75** (2): 125-131.
- ✓ Škeřikova A., Brabec I., Kuchta R., Jimenez J.A., Garcia H.H., Scholz T. (2006). Is the human-infecting *Diphyllbothrium pacificum* a valid species or just a South American population of the holarctic fish broad tapeworm, *D. latum*? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75** (2): 307-310.

- ✓ Sripa B. (2003). Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Tropica*, **88**: 209-220.
- ✓ Sripa B., Haswell-Elkins M., Sinawat P. (2003). Histological analysis of gallbladder diseases in relation to opisthorchiasis in endemic areas of Thailand. *Acta Tropica*, **88** (3): 239-246.
- ✓ Sripa B., Kaewkes S. (2002). Gall bladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini* – infected hamsters. *Acta Tropica*, **83** (1): 29-36.
- ✓ Sripa B., Sithithaworn P., Sirisinha S. (2003). *Opisthorchis viverrini* and opisthorchiasis The 21st century review. *Acta Tropica*, **88** (3): 169-170.
- ✓ Stunkard H.W. (1965). Variation and criteria for generic and specific determination of diphylobothriid cestodes. *Journal of Helminthology*, **39**: 281-296.
- ✓ Terramocci R., Pagani L., Brunati P., Gatti S., Bernuzzi A.M., Scaglia M. (2001). Reappearance of human Diphylobothriasis in a limited area of Lake Como, Italy. *Infection*, **29** (2): 93-95.
- ✓ Tesana, S., S. Kaewkes e S. Phinlaor 1986. Infectivity and survivorship of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in fermented fish. *Journal of Parasitology of the Tropical Medical Association Thailand* 9, 21-30.
- ✓ Thien P.C., Dalsgaard A., Thanh B.N., Olsen A., Murrell K.D. (2007). Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology research*, **101** (5): 1277-1284.
- ✓ Thompson R.C.A. (2000). Emerging parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30 (12-13): v
- ✓ Titova S.D. (1955). Survival of plerocercoids of *Diphylobothrium latum* in the presence of low temperature and salt. *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, 24: 255-256.
- ✓ Torres P., López J. C., Cubillos V., Lobos C., Silva R. 2002: Visceral diphylobothriosis in a cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Chile. *Journal of Fish Diseases*, **25**: 375-379.

- ✓ Travassos L. (1930). Revisao do genero *Ascocotyle* Loos, 1899 (Trematoda Heterophyidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Tomo XXIII (2): 61-79.
- ✓ Travassos L. (1931). Contribuições ao conhecimento das Heterophyidae (Trematoda). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Tomo XXV: 47-49.
- ✓ Tselepatiotis E., Mantakadis E., Papoulis S., Vassalou E., Kotsakis P., Samonis G. (2003). A case of *Opisthorchis felineus* infestation in a pilot from Greece. *Infection* **31** (6): 430-432.
- ✓ Upatham E. S., Viyanant V. (2003). *Opisthorchis viverrini* and opisthorchiasis: a historical review and future prospective. *Acta Tropica*, **88** (3): 171-176.
- ✓ Urquhart G. M., Armour J., Duncan J. L., Dunn A. M., Jennings F. W. (2001). *Parassitologia veterinaria*. UTET. Pp 121-139.
- ✓ Vaiani R., Terramocci R., Crotti D., Gustinelli A., Invernizzi S., Fioravanti M.L., Pampiglione S. (2006). Diphyllbothriasis in Como Lake, Northern Italy, an update. *Parassitologia*, **48**: 297.
- ✓ Valdimarsson G., Einarsson H., King F.J. (1985). Detection of parasites in fish muscle by candling technique. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **68**: 549-551.
- ✓ Valtonen E.T., Rintamäki P, Lappalainen M. (1989). *Triaenophorus nodulosus* and *T. crassus* in fish from northern Finland. *Folia Parasitologica*, **36**: 351-370.
- ✓ Venugopal V. (2006). *Seafood Processing*. Taylor e Francis. Pp. 46.
- ✓ Vichasri S., Viyanant V., Upatham E. S. (1982) *Opisthorchis viverrini*: intensity and rates of infection in cyprinoid fish from an endemic focus in northeast Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **13** (1):138-141.
- ✓ Von Bonsdorff B (1948). Pernicious anemia caused by *Diphyllbothrium latum*, in the light of recent investigations. *Blood*, **3** (1): 91-102.
- ✓ Von Bonsdorff B, Bylund G. (1982). The ecology of *Diphyllbothrium latum*. *Ecology of Diseases*, **1**: 21-26.

- ✓ Von Bonsdorff B. (1977). *Diphyllobothriasis in Man*. London: Academic Press.
- ✓ Waikagul J. (1974). Study of infectivity of *Opisthorchis viverrini* metacercariae. MSc Thesis, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University Bangkok.
- ✓ Waikagul J. (1991). Intestinal fluke infections in southeast Asia. *The southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **22**: 158-162.
- ✓ WHO (1979). WHO expert committee on parasitic zoonoses. Geneva: WHO technical Report series n. 637.
- ✓ WHO (1995). Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series, 849, WHO Geneva.
- ✓ WHO (2004). Report of joint WHO/FAO workshop on foodborne trematode infections in Asia, Ha noi Vietnam 26-28 November 2002, WHO, WPRO 1-58.
- ✓ Wicht B., de Marval F., Peduzzi R. (2007). *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Yamane et al., 1986) in Switzerland: first molecular evidence and case reports. *Parasitology International*, **56**(3): 195-9.
- ✓ Wicht B., Ruggeri N., De Marval, Riccardi N., Tonolla M., De Marta A., Peduzzi R. (2007a). Monitoring and molecular characterization of *Diphyllobothrium* spp. in the subalpine lake region. *66th Annual Assembly of the Swiss Society of Microbiology, Interlaken, 1-2 March 2007*.
- ✓ Wicht B., Tonolla M., Riccardi N., Giussani G., Nicolaud J., Dupouy-Camet J., Peduzzi R. (2006) *Diphyllobothrium latum* in intermediate hosts of the Lago Maggiore and other Swiss lakes. *Abstracts of the 11th International Congress of Parasitology, Glasgow, 6-11 August 2006*.
- ✓ Williams H.H., Jones A. (1994). Parasitic worms of fish. Ed. Taylor e Francis, London, UK, 593 pp.
- ✓ Wongratanacheewin S., Sermiswan R. W., Sirisinha S. (2003). Immunology and molecular biology of *Opisthorchis viverrini* infection. *Acta Tropica*, **88**: 195-207.

- ✓ Woo P.T.K. (1996). Fish diseases and disorders. Volume 1. Ed. Cab International, Wallingford, UK. pp. 808
- ✓ Wotten R., Smith J.W. (1979). The occurrence of plerocercoids of *Diphyllbothrium* spp. in wild and cultured salmonids from the loch Awe area. *Scottish Fisheries Research Report*, **13**: 1-8.
- ✓ Wykoff D. E., Harinasuta C., Juttijudata P., Winn M. M. (1965). *Opisthorchis viverrini* in Thailand – The Life Cycle and Comparison with *O. felineus*. *The Journal of Parasitology*, **51** (2):207-214.
- ✓ Yamaguti S. (1958). *Systema Helminthum*. 1. The digenetic trematodes of vertebrates. Part. 1 and 2. Interscience Publishers, Inc. ed., New York.
- ✓ Yamane Y., Kamo H., Bylund G., Wikgren B.J. (1986). *Diphyllbothrium nihonkaiense* sp. nov. (Cestoda: Diphyllbothriidae) - revised identification of Japanese broad tapeworms. *Shimane Journal of Medical Science*, **10**: 29–48.
- ✓ Yera H., Estran C., Delaunay P., Gari-Toussaint M., Dupouy-Camet J., Marty P. (2006). Putative *Diphyllbothrium nihonkaiense* acquired from a Pacific salmon (*Oncorhynchus keta*) eaten in France; genomic identification and case report. *Parasitology International*, **55**: 45–49.
- ✓ Yossepowitch O., Gotesman T., Assous M., Marva E., Zimlichman R., Dan M. (2004). Opisthorchiasis from imported raw fish. *Emerging Infectious Diseases*, **10** (12): 2122-2126.
- ✓ Yu S.H., Mott K.E. (1994). Epidemiology and Morbidity of food-borne intestinal trematode infection. *Tropical Disease Bulletin*, **91** (7): R125-R150.
- ✓ Zviagina V.V., Beer S.A. (1997). The disinfection of fish in the family Cyprinidae of *Opisthorchis felineus* Riv. metacercariae by the combined use of acetic acid and table salt. *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, **1**: 9-12.

Siti Internet consultati:


www.fibozopa.ria1.org

www.salinadicervia.it

www.agraria.org

www.fao.org/docrep/009/a0699e/A0699E00.htm

ALLEGATO I

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 1 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0


L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

ESAME PARASSITOLOGICO A FRESCO IN SPECIE ITTICHE

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Resp. Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
RAQD	Emanuele Scalisi		
Resp. laboratorio ITT	Marialetizia Fioravanti		
Docente afferente laboratorio ITT	Roberta Galuppi		
Docente afferente laboratorio ITT	Maria Paola Tampieri		
Borsista	Monica Caffara		
Specializzando	Federica Marcer		
Dottorando di ricerca	Daniela Florio		


Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Marialetizia Fioravanti	15/05/02	Marialetizia Fioravanti	06/06/02	Marialetizia Fioravanti	19/06/02
Monica Caffara					

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 2 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALE E APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

ALLEGATO 1 - Scheda Esame Parassitologico

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 3 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente Istruzione Operativa ha lo scopo di descrivere le procedure utili ad effettuare la ricerca di parassiti in specie ittiche mediante l'osservazione visiva diretta e l'osservazione microscopica di "preparati a fresco" ottenuti da organi e tessuti.


Questa procedura si applica a tutte le specie ittiche che pervengono presso il Laboratorio di Prova di Ittiopatologia per cui sia richiesto o venga ritenuto opportuno effettuare l'esame parassitologico a fresco.

2. RIFERIMENTI

- "Fish Disease-Diagnosis and Treatment", Noga E.J., Mosby, St.Louis, 1996.
- "Fish Pathology" 2nd Ed., Roberts R.J., Baillière Tindall, London, UK, 1989.
- "Tecnologia e Patologia in Acquacoltura", Ghittino P., Tipografia Emilio Bono, Torino, 1985.
- "Fish Diseases", vol I Schaperclaus W., Eds Schaperclaus W, Kulow H., Schreckenbach K. A.A. Balkema, Rotterdam, 1992.
- "Manual of Ornamental Fish" B.S.A.V.A., Ed Butcher R.L. J. Looker printers, Poole Dorset USA, 1992.
- "Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine", Ed. L. Brown, Pergamon Press, Oxford U.K.
- "Aquariology: the science of fish health management", Ed. Gratzek J.B., Matthews J.R., Tetra Press Publ., Blacksburg, USA, 1992.
- "Protozoan parasites of fishes" Lom J., Dykova I., Elsevier, Amsterdam, ND, 1992.
- SOP MIPAV ITT 10.01.01 "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche"
- SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato"

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

- **Specie ittiche**: tutti i pesci d'acqua dolce, salmastra o salata provenienti da allevamento o da acque libere.
- **Parassita**: organismo che vive all'interno (endoparassita) o all'esterno (ectoparassita) di un altro organismo (ospite) causando danni.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 4 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

- **Preparato a fresco:** preparato ottenuto per raschiamento o schiacciamento diretto di organi e tessuti ed osservato senza sottoporlo a tecniche di colorazione o ad altri trattamenti particolari.

- **Scheda Esame Parassitologico:** scheda da compilare con tutte le risultanze derivanti dalla conduzione dell'esame parassitologico sul campione in esame.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

Personale docente e tecnico afferente al Laboratorio di Prova di Ittiopatologia, nonché personale non strutturato autorizzato dal Responsabile di Laboratorio di Ittiopatologia.


5. PARAMETRI AMBIENTALI

N.A.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

6.1 Materiali

Guanti in gomma
 Guanti in lattice monouso
 Carta assorbente
 Forbici in acciaio inox di varie dimensioni
 Pinze anatomiche e chirurgiche in acciaio inox di varie dimensioni
 Bacinelle in plastica
 Lame da bisturi
 Manico porta lama da bisturi
 Soluzione fisiologica (8,5% NaCl)
 Acqua deionizzata
 Aghi da dissezione
 Capsule petri monouso
 Vetrini portaoggetto
 Vetrini coprioggetto
 Siringhe monouso di varia misura
 Scheda Esame Parassitologico

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 5 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

6.2 Apparecchiature

Stereomicroscopio

Microscopio ottico con obiettivi a diverso ingrandimento (4x-10x-40x-100x)

7. MODALITÀ PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA

7.1 Trattamento del campione

Procedere come indicato nel punto 7.1 della SOP MIPAV ITT 10.01.01 "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche".


7.2 Conduzione dell'esame parassitologico a fresco

- Porre il soggetto da esaminare in una bacinella in plastica pulita
- Osservare attentamente la superficie cutanea, le pinne, le fossette nasali (quando ben sviluppate), gli occhi e la cavità buccale e rilevare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente.
- Con l'ausilio di un vetrino coprioggetto effettuare un raschiamento gentile del muco cutaneo seguendo la direzione delle squame (nelle specie ittiche prive di squame procedere comunque in senso antero-posteriore) (Fig. 1*). Il raschiamento va condotto in diversi punti della superficie corporea, ed in particolare nella zona del dorso sottostante la pinna dorsale, sui fianchi e sull'area sottostante le pinne pettorali. Nel caso il muco cutaneo asportato si presenti molto compatto, aggiungere con una pipetta in plastica monouso una goccia di acqua deionizzata nel caso si tratti di pesci d'acqua dolce o di soluzione fisiologica nel caso si tratti di pesci d'acqua salmastra o salata., Porre un vetrino coprioggetto al di sopra del materiale schiacciando gentilmente con il dorso di una pinza ed osservare dapprima visivamente e quindi al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Ripetere la stessa operazione operando il raschiamento su pinne, opercoli e superficie del cranio.
- Asportare gli opercoli seguendo le indicazioni riportate nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01, quindi procedere al prelievo di alcuni filamenti branchiali, recidendoli con le forbici da un arco branchiale facendo attenzione a non asportare anche porzioni della struttura ossea di sostegno dell'arco branchiale (Fig. 2*). Porre i filamenti


 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 6 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

branchiali asportati su un vetrino, aggiungere una goccia di acqua deionizzata nel caso si tratti di pesci d'acqua dolce o di soluzione fisiologica nel caso si tratti di pesci d'acqua salmastra o salata, porre un vetrino coprioggetto al di sopra dei filamenti schiacciando gentilmente con il dorso di una pinza ed osservare al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.


- Procedere all'asportazione degli archi branchiali, come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01, porli in una capsula petri monouso ed osservarli allo stereomicroscopio rilevando l'eventuale presenza di parassiti individuabili ad un ingrandimento massimo di 50x.
- Procedere quindi all'apertura della cavità corporea, seguendo le indicazioni riportate nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Osservare gli organi così esposti al fine di verificare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente.
- Asportare il pacchetto viscerale come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01 e porlo in una capsula petri monouso o in una bacinella in plastica (a seconda delle dimensioni del soggetto). Osservare gli organi così prelevati per verificare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente
- Procedere all'isolamento di fegato, milza e cistifellea come descritto nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Effettuare con l'ausilio delle forbici il prelievo di una piccola porzione di fegato (diametro di circa 1 mm) e porla su un vetrino portaoggetti. Porre sul frammento di organo un vetrino coprioggetto ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza per rendere il preparato il più sottile possibile. Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Effettuare con l'ausilio delle forbici il prelievo di una piccola porzione della milza (diametro di circa 1 mm) e porla su un vetrino portaoggetti. Porre sul frammento di organo un vetrino coprioggetto ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza per rendere il preparato il più sottile possibile. Osservare al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Isolare la cistifellea afferrandola con una pinza anatomica a livello del suo attacco al fegato e porla su un vetrino portaoggetti. Inserire un ago da dissezione nella parete fino a far fuoriuscire la bile, quindi asportare la parete con una pinza e porla su un altro

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 7 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

- vetrino portaoggetti. Prelevare un frammento della parete ed eliminare la parte restante dell'organo. Porre sia sulla bile che sul frammento di parete un vetrino coprioggetto ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza. Osservare i due preparati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Procedere all'apertura longitudinale dello stomaco e dell'intestino come descritto nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Osservare il contenuto gastrico e intestinale per rilevare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Effettuare con un vetrino coprioggetto un raschiamento della mucosa gastrica e con un altro vetrino un raschiamento di quella intestinale, quindi porli rispettivamente su due vetrini portaoggetto esercitando una pressione gentile con il dorso di una pinza. Osservare i due preparati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
 - Procedere al prelievo di una piccola porzione di parete dell'intestino (diametro di 1-2 mm) e porla su un vetrino portaoggetto coprendola quindi con un vetrino coprioggetto. Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti. Nel caso lo spessore della parete intestinale sia troppo grosso per poter permettere una idonea osservazione microscopica, procedere ad un raschiamento profondo della mucosa in modo da ottenere un preparato sottile.
 - Procedere quindi all'osservazione visiva delle gonadi rimaste *in situ* in cavità addominale (nei soggetti che stiano raggiungendo o abbiano raggiunto la maturità sessuale) quindi procedere alla loro asportazione come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Prelevare un piccolo frammento del tessuto gonadico (diametro di 1 mm) e porla su un vetrino portaoggetto coprendola quindi con un vetrino coprioggetto. Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti. Prelevare quando possibile anche una piccola porzione del dotto gonadico e porla su un vetrino portaoggetto, coprendola con un vetrino coprioggetto e osservando poi il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 8 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

- Osservare la vescica natatoria rimasta *in situ* rilevando l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Procedere quindi alla sua asportazione come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Aprire la vescica natatoria effettuando con le forbici un occhio nella parete e procedendo nel taglio per tutta la sua lunghezza (quando le dimensioni dell'organo lo consentono). Effettuare con un coprioggetto un raschiamento della parete interna della vescica natatoria, quindi porre il vetrino coprioggetto su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Osservare il rene rimasto *in situ* in cavità addominale, quindi procedere all'asportazione con lama da bisturi di una piccola porzione (diametro di 1 mm) dell'organo. Porla su un vetrino portaoggetto coprendola quindi con un vetrino coprioggetto ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza. Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Aprire con le forbici il sacco pericardico ed osservare il cuore *in situ*, quindi procedere alla sua asportazione recidendo con le forbici il bulbo arterioso. Aprire con le forbici la cavità cardiaca ed il bulbo arterioso, rilevando visivamente l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente, quindi prelevare con un vetrino coprioggetto una goccia del sangue contenuto, porlo su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Procedere all'asportazione dell'occhio mediante dissezione dei tessuti lassi circostanti e recisione del nervo ottico. Porre l'organo in una capsula petri monouso, sezionarlo con una lama da bisturi e procedere al prelievo dell'umor vitreo contenuto nella cavità oculare con l'ausilio di un vetrino coprioggetto. Porlo su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti. Estrarre con un paio di pinze il cristallino e porlo su un vetrino portaoggetto, quindi procedere alla sua osservazione allo stereomicroscopio per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.
- Aprire la calotta cranica ed estrarre il cervello come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01. Prelevare un piccolo frammento del cervello (diametro di 1 mm) e porlo su un vetrino portaoggetto coprendolo quindi con un vetrino coprioggetto.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 9 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.

- Procedere alla dissezione del tessuto muscolare come indicato nel punto 7.2 della SOP MIPAV ITT 10.01.01 osservando l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Prelevare con lama da bisturi piccole porzioni di tessuto muscolare (diametro di 0,5-1 mm) e porle su vetrino portaoggetto. Coprirle con vetrino coprioggetto ed operare uno schiacciamento gentile apponendo un vetrino portaoggetti che viene poi tolto prima dell'osservazione microscopica. Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.

Nota bene 1: Nel caso i soggetti da sottoporre all'esame parassitologico siano di dimensioni troppo ridotte per poter operare la corretta dissezione di alcuni organi (ad esempio l'apparato gastroenterico), si può procedere all'osservazione microscopica dell'organo *in toto* o di una parte di esso previo schiacciamento diretto sotto vetrino coprioggetto.


Nota bene 2: L'identificazione dei parassiti riscontrati nel corso dell'esame parassitologico a fresco viene condotta seguendo le procedure che vengono illustrate nelle specifiche Istruzioni Operative.

*Le immagini indicate nel testo come Fig. 1 e Fig. 2 sono consultabili nella copia cartacea della presente Istruzione Operativa depositata presso l'Archivio dell'Ufficio Qualità del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale nel raccoglitore del Laboratorio di Prova MIPAV di Ittiopatologia (ITT).

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

Annotare sulla Scheda Esame Parassitologico (vedi Allegato 1) la presenza di qualsiasi agente parassitario rilevata nel corso dell'esame parassitologico a fresco.

Nel caso appaia opportuno elaborare Schede di rilevamento diverse dal modello allegato alla presente SOP in quanto relative a ricerche particolari, possono essere elaborate Schede di diverso tipo sotto la supervisione ed autorizzazione del responsabile di laboratorio di Ittiopatologia. In ogni caso devono essere seguite le indicazioni

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 10 di 11
	SOP MIPAV ITT 10.01.02	Rev. 0

schematizzate nella Scheda Esame Parassitologico riportata in Allegato 1 quale requisito minimo.

Le Schede compilate vanno conservate nei raccoglitori inerenti la ricerca in oggetto o applicate al Quaderno di Laboratorio relativo alla ricerca (come indicato nel punto 8 della SOP MIPAV ITT 10.02.01). Nel caso si tratti di esami parassitologici condotti su campioni pervenuti come prestazioni a pagamento o comunque estranei alle ricerche in corso presso il Laboratorio di Prova di Ittiopatologia, vanno conservate nel raccoglitore identificabile dalla dicitura "Raccoglitore Schede Campioni Esaminati presso il Laboratorio di Prova di Ittiopatologia" e conservate indefinitamente. In ogni caso sul registro di laboratorio vanno riportati gli estremi per il facile reperimento delle stesse, come indicato nella SOP MIPAV ITT 10.02.01.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

Le procedure descritte nella presente Istruzione Operativa vanno condotte utilizzando mezzi di protezione individuali, quali guanti di gomma o guanti in lattice monouso.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Al termine della prova gli strumenti utilizzati per la conduzione dell'esame parassitologico vanno sottoposti ad ebollizione per circa 10 minuti.

I rifiuti biologici e tutto il materiale contaminato viene trattato come descritto nella SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato".

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 1 di 1 Allegato 1
	SOP MIPAV ITT 10.01.02 Scheda Esame Parassitologico	Rev. 0

LABORATORIO DI ITTIOPATOLOGIA

Scheda Esame Parassitologico

Data.....

N° Registro ITT.....

Informazioni relative al cliente:

Allevamento/committente:	N° Tel./Fax:
--------------------------	--------------

Informazioni relative al campione:

Specie ittica:	Età/Taglia:	N° soggetti:
Condizioni del campione: vivo <input type="checkbox"/> morto fresco <input type="checkbox"/> morto poco fresco <input type="checkbox"/> morto non idoneo <input type="checkbox"/> congelato <input type="checkbox"/> fissato in formalina <input type="checkbox"/> fissato in alcool <input type="checkbox"/>		
Mortalità: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave <input type="checkbox"/> da giorni		Trattamenti: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> con.....
Sintomi:.....		

Tabella di rilevamento della presenza di parassiti

Organo	Parassiti	Note
Branchie		
Cute/Pinne		
Bocca		
Milza		
Fegato		
Rene		
Stomaco		
Intestino		
Vesc. natatoria		
Gonadi		
Muscolo		
Occhio		
Cervello		
Cuore		

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	ISTRUZIONE OPERATIVA	Pag. 1 di 1 Allegato 1
	SOP MIPAV ITT 10.01.02 Scheda Esame Parassitologico	Rev. 0

Data fine esame.....

Firma

ALLEGATO II

SCHEDA RILEVAMENTO LARVE PLEROCERCOIDI

NRL ITT

LOCALITÀ

SPECIE ITTICA

	Plerocercoidi	MD	MV	Visceri	Note
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					
15.					
16.					
17.					
18.					
19.					
20.					
21.					
22.					
23.					
24.					
25.					
26.					
27.					
28.					
29.					
30.					
31.					
32.					
33.					
34.					
35.					
36.					
37.					
38.					
39.					
40.					
41.					
42.					
43.					
44.					
45.					
46.					
47.					
48.					
49.					
50.					

ALLEGATO III

DATA _____

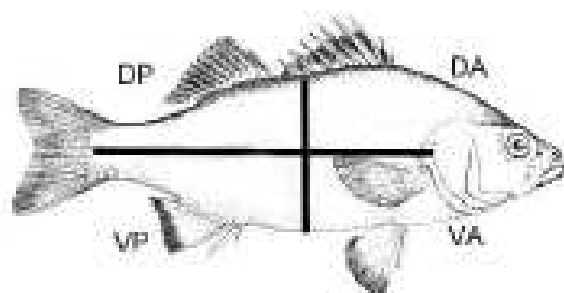
NRL ITT _____

SPECIE ITTICA _____

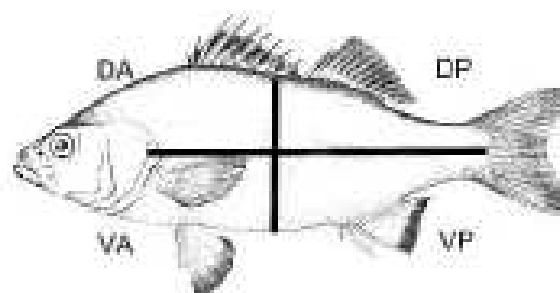
PROVENIENZA _____

SOGGETTO N° _____

DX



SX



LARVE PLEROCERCOIDI LOCALIZZATE A LIVELLO MUSCOLARE: _____

IDENTIFICAZIONE: _____

LARVE PLEROCERCOIDI LOCALIZZATE NEL PACCHETTO VISCERALE: _____

PERITONEO _____ FEGATO _____ MILZA _____

RENE _____ INTESTINO _____ GONADI _____

IDENTIFICAZIONE: _____

TOTALE LARVE PLEROCERCOIDI: _____

ALTRE SPECIE PARASSITARIE RILEVATE

LOCALIZZAZIONE: _____

NOTE EVENTUALI: _____